

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年 4月19日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-117458

出 願 人

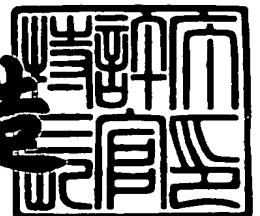
Applicant(s):

三共株式会社

2001年 4月20日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3034033

【書類名】 特許願

【整理番号】 2000045SW

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/31  
C12N 1/15

【発明者】

【住所又は居所】 福島県いわき市泉町下川字大劔 3 8 9 - 4 三共株式会社  
社内

【氏名】 阿部 有生

【発明者】

【住所又は居所】 福島県いわき市泉町下川字大劔 3 8 9 - 4 三共株式会社  
社内

【氏名】 小野 千穂

【発明者】

【住所又は居所】 福島県いわき市泉町下川字大劔 3 8 9 - 4 三共株式会社  
社内

【氏名】 吉川 博治

【特許出願人】

【識別番号】 000001856

【氏名又は名称】 三共株式会社

【代理人】

【識別番号】 100081400

【弁理士】

【氏名又は名称】 大野 彰夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100092716

【弁理士】

【氏名又は名称】 中田 ▲やす▼雄

【選任した代理人】

【識別番号】 100096666

【弁理士】

【氏名又は名称】 室伏 良信

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 010216

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9704937

【包括委任状番号】 9704935

【包括委任状番号】 9704936

【プルーフの要否】 要

【書類名】明細書

【発明の名称】ML-236B生合成促進cDNA(R)

【特許請求の範囲】

【請求項1】以下の群から選択されるDNA。

(a) 配列表の配列番号37のヌクレオチド番号1乃至1380で示される塩基配列を1つ又は複数含むことからなり、ML-236B生産菌内に導入されることにより該生産菌のML-236B生合成を促進することを特徴とするDNA:

(b) (a) 記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、ML-236B生産菌内に導入されることにより該生産菌のML-236B生合成を促進することを特徴とするDNA。

【請求項2】形質転換大腸菌 *E. coli* pSAKexpR SANK 72599株 (FERM BP-7006) より得ることができる、請求項1記載のDNA。

【請求項3】請求項1又は2記載のDNAを含む組換えDNAベクター。

【請求項4】形質転換大腸菌 *E. coli* pSAKexpR SANK 72599株 (FERM BP-7006) に保持される、請求項3記載の組換えDNAベクター。

【請求項5】請求項3又は4記載の組換えDNAベクターで形質転換された宿主細胞。

【請求項6】ML-236B生産菌であることを特徴とする請求項5記載の宿主細胞。

【請求項7】ペニシリウム・シトリナム (*Penicillium citrinum*) であることを特徴とする、請求項6記載の宿主細胞。

【請求項8】請求項6又は7記載の宿主細胞を培養し、次いで該培養物からML-236Bを回収することを特徴とする、ML-236Bの製造法。

【請求項9】大腸菌であることを特徴とする、請求項5記載の宿主細胞。

【請求項10】形質転換大腸菌 *E. coli* pSAKexpR SANK 72599 (FERM BP-7006) である、請求項9記載の宿主細胞。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、HMG-C<sub>o</sub>A還元酵素阻害剤ML-236B生産菌のML-236B生合成を促進することを特徴とするDNA、該DNAを組み込んだ組換えDNAベクター、該組換えDNAベクターで形質転換された宿主細胞、該宿主細胞の培養物からML-236Bを回収することを特徴とするML-236Bの製造法等に関する。

【0002】

【従来の技術】

プラバスタチンナトリウムは高脂血症改善薬として臨床において使用されているHMG-C<sub>o</sub>A還元酵素阻害剤である。プラバスタチンは、ペニシリウム・シトリナムが生産するML-236Bをストレプトミセス・カルボフィラス (*Streptomyces carbophilus*) により微生物変換することにより得られる (Endo, A., et al., J. Antibiot., 29, 1346 (1976) : Matsuoka, S., et al., Eur. J. Biochem., 184, 707 (1989) 記載 : 特開昭 5 7 - 2 2 4 0 号公報記載)。

【0003】

プラバスタチンの前駆体ML-236B、及び、プラバスタチンと部分構造を共有するHMG-C<sub>o</sub>A阻害剤ロバスタチンは、ともにポリケチドを経て生合成されることが示されている (Moore, R. N., et al., J. Am. Chem. Soc., 107, 3694 (1985) : Shiao, M. and Don, H. S., Proc. Natl. Sci. Counc. ROC., 11, 223 (1987) 記載)。

【0004】

ポリケチドとは、酢酸、プロピオン酸、酪酸などの低分子カルボン酸残基の連続的な縮合反応から生じるβ-ケト炭素鎖から導かれる化合物の総称であり、各β-ケトカルボニル基の縮合・還元様式により、多様な構造が導かれる (Hopwood, D. A. and Sherman, D. H., Annu. Rev. Genet., 24, 37-66 (1990) : Hutchinson, C. R. and Fujii, I., Annu. Rev. Genet., 49, 201-238 (1995) 記載)。

【0005】

ポリケチドの合成を担うポリケチド・シンターゼ (Polyketide S

ynthase : 以下、「PKS」という。) は糸状菌や細菌の有する酵素であることが知られており、糸状菌では該酵素の分子生物学的研究がなされている (Feng, G.H. and Leonard, T.J., J. Bacteriol., 177, 6246 (1995) : Takano, Y., et al. Mol. Gen. Genet. 249, 162 (1995) 記載)。ロバスタチン生産菌であるアスペルギルス・テレウス (*Aspergillus terreus*) については、ロバスタチン生合成に関連した PKS 遺伝子の解析がなされている (特表平 9-504436 号公報記載)。

## 【0006】

ところで、糸状菌の二次代謝産物の生合成関連遺伝子は、ゲノム上でクラスターを形成していることが少なくない。ポリケチドの生合成系にて、該系に関与する遺伝子クラスターの存在が知られている。アスペルギルス・フラヴァス (*Aspergillus flavus*)、アスペルギルス・パラシティカス (*Aspergillus parasiticus*) の生産するポリケチドであるアフラトキシンの生合成では、PKS その他ポリケチドの生合成に関与する酵素蛋白質をコードする遺伝子がクラスター構造を形成していることが知られており、両菌のアフラトキシン生合成関連遺伝子のゲノム比較解析が行なわれている (Yu, J., et al, Appl. Environ. Microbiol., 61, 2365 (1995) 記載)。アスペルギルス・ニジュランス (*Aspergillus nidulans*) の生産するステリグマトシスチンの生合成関連遺伝子は、ゲノム上の連続する約 60 kb の領域においてクラスター構造を形成していることが報告されている (Brown, D.W., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 1418 (1996) 記載)。

## 【0007】

しかし、ML-236B 生合成に関する分子生物学的研究は、現在まで十分にはなされていなかった。

## 【0008】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明者らは、ペニシリウム・シトリナムの ML-236B 生合成に関連するゲノム DNA (以下、「ML-236B 生合成関連ゲノム DNA」という。) を、ML-236B 生産菌のゲノム DNA ライブラリーよりクローニングし、該ゲノム DNA を解析して該ゲノム DNA 上に構造遺伝子を見出し、ペニシリウム・シトリナムの mRNA を鋳型とした逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse tr

anscription - polymerase chain reaction: 以下、「RT-PCR」という。

) により該構造遺伝子に対応する cDNA を得、該 cDNA を含む組換え DNA ベクターを用いて該生産菌を形質転換することにより、該生産菌において ML-236B の生合成が促進されることを見出し、本発明を完成した。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明は、

(1)

以下の群から選択される DNA、

(a) 配列表の配列番号 37 のヌクレオチド番号 1 乃至 1380 で示される塩基配列を 1 つ又は複数含むことからなり、ML-236B 生産菌内に導入されることにより該生産菌の ML-236B 生合成を促進することを特徴とする DNA:

(b) (a) 記載の DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、ML-236B 生産菌内に導入されることにより該生産菌の ML-236B 生合成を促進することを特徴とする DNA、

(2) 形質転換大腸菌 *E. coli* pSAKexpR SANK 72599 株 (FERM BP-7006) より得ることができる、(1) 記載の DNA

(3)

(1) 又は (2) 記載の DNA を含む組換え DNA ベクター、

(4)

形質転換大腸菌 *E. coli* pSAKexpR SANK 72599 株 (FERM BP-7006) に保持される、(3) 記載の組換え DNA ベクター、

(5)

(3) 又は (4) 記載の組換え DNA ベクターで形質転換された宿主細胞、

(6)

ML-236B 生産菌であることを特徴とする (5) 記載の宿主細胞、

(7)

ペニシリウム・シトリナム (*Penicillium citrinum*) であることを特徴とする、  
(6) 記載の宿主細胞、

(8)

(6) 又は (7) 記載の宿主細胞を培養し、次いで該培養物から ML-236 B を回収することを特徴とする、ML-236 B の製造法、

(9)

大腸菌であることを特徴とする、(5) 記載の宿主細胞、及び、

(10)

形質転換大腸菌 *E. coli* pSAKexpR SANK 72599 (FERM BP-7006) である、(9) 記載の宿主細胞、  
に関する。

【0010】

【発明の実施の形態】

以下、本発明をより詳細に説明する。

【0011】

本発明は、ML-236 B 生産菌内に導入されることにより該生産菌の ML-236 B 生合成を促進することを特徴とする cDNA (以下、「ML-236 B 生合成促進 cDNA」という。) 等に関する。

【0012】

本発明の ML-236 B 生合成促進 cDNA は、ML-236 B 生産菌のゲノム遺伝子中の ML-236 B 生合成関連ゲノム DNA 上に存在する構造遺伝子の転写産物 (メッセンジャー RNA: 以下、「mRNA」という。) を鋳型として合成された DNA (I)、該 DNA 及び該 DNA を第一鎖として合成された第二鎖 DNA が会合して生じる二本鎖 DNA (II)、該二本鎖 DNA をクローニング等の手法により複製若しくは増幅することによって得られる二本鎖 DNA (III)、又は、これら DNA のいずれか一つとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA (IV) である。(IV) の DNA としては、配列表の配列番号 37 のヌクレオチド番号 1 乃至 1380 に示される塩基配列に 1 つ又は複数のヌクレオチドの置換、欠失及び／又は付加が生じたものであり、ML-23



6 B 生産菌内に導入されることにより該菌の ML-236B の生合成を促進するものである。なお、本発明において、ハイブリダイズとは、2 本の一本鎖核酸同士が互いに相補的な領域又は相補性の高い領域において二本鎖を形成することをいい、ストリンジェントな条件とは、ハイブリダイゼーション液の組成が 6 × S S C ( 1 × S S C の組成は、150 mM NaCl、15 mM クエン酸三ナトリウム。 ) であり且つハイブリダイゼーションを行なう際の保温温度が 55℃ の場合をいう。

## 【 0 0 1 3 】

このような ML-236B 生合成促進 cDNA は、ML-236b 生産菌の cDNA ライブラリーから所望の cDNA を含むクローンを単離する方法、又は ML-236B 生合成関連 DNA の塩基配列に基いて作製される一組のプライマー及び ML-236B 生産菌の mRNA 若しくは全 RNA を使用する RT-PCR により得ることができる。

## 【 0 0 1 4 】

本発明において、ML-236B 生産菌とは、ML-236B 生産能を先天的に有する微生物をいう。ML-236B 生産菌としては、例えば、ペニシリウム ( *Penicillium* ) 属に属する ML-236B 生産菌が挙げられ、ペニシリウム・シトリナム、ペニシリウム・ブレビコンパクタム ( *Penicilium brevicompactum* : Brown, A.G., et al., J.Chem.Soc.Perkin-1., 1165 (1976) 記載 )、ペニシリウム・シクロピウム ( *Penicillium cyclopium* : Doss, S.L., et al., J.Natl.Prod., 49, 357 (1986) 記載 ) 等が例示される。さらに、これら以外に、ユーペニシリウム・エスピー M6603 ( *Eupenicillium* sp.M6603 : Endo, A., et al., J.Antibiot.-Tokyo, 39, 1609 (1986) 記載 )、ペシロミセス・ビリディス FERM P-6236 ( *Paecilomyces viridis* FERM P-6236 : 特開昭 58-98092 号公報記載 )、ペシロミセス・エスピー M2016 ( *Paecilomyces* sp.M2016 : Endo, A., et al., J.Antibiot.-Tokyo, 39, 1609 (1986) 記載 )、トリコデルマ・ロンギブラチアタム M6735 ( *Trichoderma longibrachiatum* M6735 : Endo, A., et al., J.Antibiot.-Tokyo, 39, 1609 (1986) 記載 )、ヒポミセス・クリソスペルムス IFO 7798 ( *Hypomyces chrysospermus* IFO 7798 : Endo, A., et al., J.Antib

iot.-Tokyo,39,1609(1986)記載)、グリオクラディウム・エスピー YJ-9515 (Gliocladium sp. YJ-9515: WO 9 8 0 6 8 6 7 号公報記載)、トリコデルマ・ビリデ IFO 5836 (Trichoderma viride IFO 5836: 特公昭62-1915号公報記載)、ユーベニシリウム・レチクリスポルム IFO 9022 (Eupenicillium reticulisporum IFO 9022: 特公昭62-19159号公報記載)等が挙げられる。これらのML-236B生産菌のうち、好適にはペニシリウム・シトリナムであり、より好適にはペニシリウム・シトリナム SANK13380株である。ペニシリウム・シトリナム SANK13380株は、平成4年(1992年)12月22日付けで、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号の通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に国際寄託され、受託番号FERM BP-4129を付与された。

【0015】

ML-236B生合成関連ゲノムDNAは、ML-236B生産菌のゲノムDNAライブラリーに対して、類似の機能を有するものと推測される糸状菌由来のDNAの塩基配列に基いて設計されるプローブを用いてスクリーニングを行なうことにより得ることができる。

【0016】

ゲノムDNAライブラリーの作製法としては、通常真核生物のゲノムDNAライブラリーを作製するための方法であれば特に限定されないが、例えば、マニァティスらの方法 (Maniatis,T.,et al.,Molecular cloning,a laboratory manual,2nd ed.,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,N.Y.(1989)記載)等が挙げられる。

【0017】

ML-236B生産菌のゲノムDNAは、該生産菌培養物から菌体を回収して物理的に破碎した後、核内DNAを抽出、精製することにより得られる。

【0018】

ML-236B生産菌の培養は、各ML-236B生産菌に適した条件下で行なうことができる。好適なML-236B生産菌であるペニシリウム・シトリナムの培養は、該菌体を培養したスラントから、MBG3-8培地(組成;7%(w

/v)グリセリン、3 % (w/v)グルコース、1 % (w/v)大豆粉、1 % (w/v)ペプトン (極東製薬工業 (株) 製)、1 % (w/v)コーンスチープリカー (ホーネンコーポレーション (株) 製)、0. 5 % (w/v)硝酸ナトリウム、0. 1 % (w/v)硫酸マグネシウム七水和物、p H 6. 5) へ該菌体を接種し、2 2 乃至 2 8℃、3 乃至 7 日間、振盪しつつ保温することにより行なうことができる。該スラントは、溶解させた P G A 寒天培地 (組成; 2 0 0 g / L 馬鈴薯抽出液、1 5 % (w/v)グリセリン、2 % (w/v)寒天) を試験管に注ぎ、傾斜させつつ固化させたものに、白金耳を用いてペニシリウム・シトリナムを接種し、2 2 乃至 2 8℃、7 乃至 1 5 日保温することにより作製する。該スラントを 0 乃至 4℃で保存することにより、該スラント上で該菌を継続的に生存させることができる。

## 【 0 0 1 9 】

液体培地で培養した M L - 2 3 6 B 生産菌の菌体は、遠心分離により、固体培地で培養した該菌の菌体は、セル・スクレーパー等のかきとることにより、それぞれ回収することができる。

## 【 0 0 2 0 】

菌体の物理的破碎は、菌体を液体窒素等で凍結しつつ乳鉢と乳棒ですり潰すことにより行なうことができる。破碎された菌体の核内 D N A の抽出は、ドデシル硫酸ナトリウム (s o d i u m d o d e c y l s u l p h a t e : 以下、「S D S」という。) 等の界面活性剤を用いて行なうことができる。抽出されたゲノム D N A は、フェノール・クロロホルム抽出を行なうことにより除タンパクされ、エタノール沈澱を行なうことにより沈澱として回収することができる。

## 【 0 0 2 1 】

得られたゲノム D N A を適当な制限酵素で限定分解させ、断片化する。限定分解に使用される制限酵素としては、通常入手可能な制限酵素であれば特に限定されないが、例えば、S a u 3 A I 等を挙げることができる。断片化された D N A をゲル電気泳動に供し、適当なサイズのゲノム D N A を含むゲルから D N A を回収する。D N A 断片のサイズには特に限定はないが、好適には 2 0 k b 以上である。

## 【 0 0 2 2 】

ゲノムDNAライブラリー作製用のDNAベクターとしては、該DNAベクターで形質転換された宿主細胞内で複製されるのに必要な塩基配列を有するものであれば特に限定されないが、例えば、プラスミドベクター、ファージベクター、コスミドベクター、BACベクター等が挙げられ、好適にはコスミドベクターである。また、これらDNAベクターは発現ベクターであってもよい。さらに、該DNAベクターは、該DNAベクターで形質転換された宿主細胞に表現形質（表現型；Phenotype）の選択性を付与する塩基配列を有していることが好ましい。

## 【0023】

該DNAベクターは、クローニング及び機能発現の双方に適用できるものであることが好ましい。該DNAベクターとしては、複数の微生物群に形質転換可能なDNAベクター、すなわちシャトルベクターを用いることが好ましい。該シャトルベクターは、少なくとも一方の微生物群の宿主細胞において複製されるのに必要な塩基配列を有する。また、シャトルベクターは複数の微生物群の宿主にそれぞれ表現形質の選択性を付与する塩基配列を有していることが好ましい。

## 【0024】

このようなシャトルベクターにより形質転換される微生物群の組合わせとしては、一方の微生物群がクローニングに適用でき且つ他方がML-236B生産能を有していれば特に限定されないが、例えば、細菌及び糸状菌の組合わせ、酵母及び糸状菌の組合わせ等が挙げられ、好適には細菌及び糸状菌の組合わせである。細菌としては、通常遺伝子工学に使用されるものであれば特に限定されないが、例えば、大腸菌、枯草菌等を挙げることができ、好適には大腸菌であり、より好適には大腸菌XL1-BlueMR株である。酵母としては、通常遺伝子工学に用いられるものであれば特に限定されないが、例えば、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 等を挙げることができる。糸状菌としては、上述のML-236B生産菌等が挙げられる。なお、本発明において微生物群は、細菌、糸状菌及び酵母から選択される。

## 【0025】

このようなシャトルベクターとしては、例えば、適当な表現型選択マーカー遺

伝子及びコス（cos）部位を有するコスミドベクター等を挙げることができ、好適には大腸菌ハイグロマイシンBホスフォトランスフェラーゼ遺伝子配列を有するプラスミドpSAK333（特開平3-262486号公報記載）にコスミドベクターpWE15（STRATAGENE社製）の有するコス（cos）部位を挿入して作製されたpSAKcos1が挙げられるが、これらに限定されない。pSAKcos1の構築手順については図1に記載されている。

【0026】

上述のML-236B生産菌ゲノムDNA断片をライゲーションしたシャトルベクターを宿主細胞に導入することにより、所望のゲノムDNAライブラリーが完成する。宿主細胞には、好適には大腸菌、より好適には大腸菌XL1-BlueMR株がそれぞれ使用される。宿主細胞が大腸菌の場合、該導入はin vitroパッケージングにより行なう。本発明において、形質転換とは、in vitroパッケージングによる外来DNAの導入も意味し、in vitroパッケージングにより外来DNAを導入された細胞も形質転換細胞の意味に包含される。

【0027】

所望のクローンのスクリーニングには、抗体又は核酸プローブを用い、好適には、核酸プローブを用いる。該核酸プローブは、糸状菌のポリケチド生合成関連遺伝子の塩基配列に基づいて作製することができる。このような遺伝子としては、ポリケチドの生合成への関与が確認され且つ塩基配列が公知のものであれば特に限定されないが、例えば、アスペルギルス・フラヴァス（*Aspergillus flavus*）、アスペルギルス・パラシティカス（*Aspergillus parasiticus*）のアフラトキシンPKS遺伝子、アスペルギルス・ニデュランス（*Aspergillus nidulans*）のストリグマトシスチンPKS遺伝子等を挙げることができる。

【0028】

該核酸プローブは、上述の公知の塩基配列に基づいて、ゲノムDNAの部分塩基配列からなるオリゴヌクレオチドプローブの合成により、またオリゴヌクレオチドプライマーを作製し、ゲノムDNAを鋳型としたポリメラーゼ連鎖反応（polymerase chain reaction：以下、「PCR」という

。 : Saiki, R.K., et al., Science, 239, 487 (1988) 記載) を行なうことにより、又は、mRNAを鋳型としたRT-PCR等により、取得することができる。

#### 【0029】

核酸プローブのML-236B生産菌からのPCR又はRT-PCRによる取得方法は、以下の通りである。PCR又はRT-PCRに使用するプライマー（以下、「PCR用プライマー」という。）の設計は、塩基配列が公知であるところのポリケチド生合成関連遺伝子の塩基配列に基づいて、好適にはアスペルギルス・フラヴァス (*Aspergillus flavus*)、アスペルギルス・パラシティカス (*Aspergillus parasiticus*) のアフラトキシンPKS遺伝子又はアスペルギルス・ニデュランス (*Aspergillus nidulans*) のストリグマトシスチンPKS遺伝子の塩基配列に基づいて設計することができる。これらのうちいずれか一つのPKSのアミノ酸配列上で種間保存性の高いアミノ酸配列を塩基配列に還元することにより、PCR用プライマーを設計することができる。アミノ酸配列から塩基配列に還元する方法としては、宿主のコドン使用頻度を考慮して単一の配列を導く方法又は多重コドンを使用して混合配列（以下、「ミックス・プライマー」という。）を導く方法の二通りが使用できる。後者の場合、塩基配列にヒポキサンチンを含むさせることにより多重度を下げることができる。

#### 【0030】

また、PCR用プライマーには、鋳型鎖とアニーリングするための塩基配列に加え、該プライマーの5'-末端に適宜塩基配列を付加させることが可能である。そのような塩基配列としては、該プライマーがPCRに使用可能であれば特に限定されないが、例えば、PCR産物についてその後のクローニング操作を行なうのに便利な塩基配列等が挙げられ、このような塩基配列として、制限酵素認識配列及び該制限酵素認識配列を含む塩基配列が挙げられる。

#### 【0031】

さらに、PCR用プライマーの設計においては、グアニン塩基の数とシトシン塩基の数の和が総塩基数の40乃至60%であることが好ましい。また、自己アニーリングし難いことが好ましい。一組のPCR用プライマーにおいては、双方のPCR用プライマー同士がアニーリングし難いことが好ましい。

【 0 0 3 2 】

また、PCR用プライマーの塩基数は、PCRに適用できれば特に限定されないが、その範囲の下限は10乃至14、上限は40乃至60であり、好適な範囲は14乃至40である。

【 0 0 3 3 】

さらに、PCR用プライマーは、好適にはDNAである。該プライマーを構成するヌクレオシドとしては、デオキシアデノシン、デオキシシチジン、デオキシチミジン及びデオキシグアノシンに加え、デオキシイノシンが挙げられる

また、PCR用プライマーの5' - 末端に位置するヌクレオシドの5' - 一位は、水酸基であるか、又は、該水酸基に一リン酸がエステル結合した状態である。

【 0 0 3 4 】

さらに、PCR用プライマーの合成は、通常核酸の合成に使用される方法、例えば、ホスフォロアミダイト法により行なうことができ、このような方法には、DNA自動合成機が好適に使用される。

【 0 0 3 5 】

PCRの鋳型としては、ML-236B生産菌のゲノムDNAが、RT-PCRの鋳型としては、ML-236B生産菌のmRNAが、それぞれ使用できる。なお、RT-PCRの鋳型としては、mRNAの代わりに全RNAを使用することも可能である。

【 0 0 3 6 】

PCR産物又はRT-PCR産物をこのものに適したDNAベクターに組込むことにより、該PCR産物又はRT-PCR産物をクローニングすることができる。該クローニングに用いるDNAベクターとしては、通常DNA断片をクローニングするのに使用されるDNAベクターであれば特に限定されない。また、PCR産物又はRT-PCR産物のクローニングを簡便に行なうキットが市販されており、このようなキットとして、例えば、Original TA Cloning Kit (Invitrogen製：DNAベクターとしてpCR2.1を使用している。) が好適に使用される。

【 0 0 3 7 】

クローニングしたPCR産物の取得は、所望のPCR産物を含んでいることを確認した形質転換宿主細胞を培養し、該細胞からプラスミドを抽出、精製し、得られたプラスミドから挿入DNA断片を回収することにより行なうことができる。

【0038】

形質転換宿主細胞の培養は、各宿主細胞に適した条件下で行なうことができる。好適な宿主細胞である大腸菌の形質転換体の培養は、LB培地（1%（w/v）トリプトン、0.5%（w/v）イーストエキストラクト、0.5%（w/v）塩化ナトリウム）で、30乃至37℃、18時間乃至2日間、振盪しつつ保温することにより行なうことができる。

【0039】

形質転換宿主細胞の培養物からのプラスミドの調製は、該宿主細胞の菌体を回収し、ゲノムDNAやタンパク質を除去することによりなされる。好適な宿主細胞である大腸菌の形質転換体の培養物からのプラスミドの調製は、マニアティスらのアルカリ法（Maniatis, T., et al., Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) 記載）により行なうことができる。また、より純度の高いプラスミドを得るためのキットが市販されており、このようなキットとして、例えば、Plasmid Mini Kit（QIAGEN社製）が好適に使用される。さらに、プラスミドの大量調製を行うキットが市販されており、このようなキットとして、例えば、Plasmid Maxi Kit（QIAGEN社製）が好適に使用される。

【0040】

得られたプラスミドのDNA濃度は、DNA試料を適宜希釈して波長260nmにおける吸光度を測定し、吸光度1=DNA50μg/mlとして算出することができる。DNAの純度は、波長280及び260nmの吸光度の比率から算出することができる。

【0041】

核酸プローブの標識は、放射性標識及び非放射性標識に大別される。放射性標識に使用される放射性核種としては、通常使用されるものであれば特に限定され



ないが、例えば、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$ 等を挙げることができ、好適には $^{32}\text{P}$ である。非放射性標識に用いる試薬としては、通常核酸の標識に用いられるものであれば特に限定されないが、例えば、ジゴキシゲニン、ビオチン等が挙げられ、好適にはジゴキシゲニンである。核酸プローブを標識する方法としては、通常使用される方法であれば特に限定されないが、例えば、標識基質を用いたPCRにより該産物中に取り込ませる方法、ニック・トランスレーション法、ランダム・プライマー法、末端標識法、標識基質を用いてオリゴヌクレオチドDNAを合成する方法等を挙げる事ができ、核酸プローブの種類等によりこれらの方法から適宜選択できる。

## 【0042】

核酸プローブの塩基配列と同一の塩基配列がML-236B生産菌のゲノム中に存在することは、該生産菌のゲノムDNAに対するサザンブロット・ハイブリダイゼーションにより確認することができる。

## 【0043】

サザンブロット・ハイブリダイゼーションは、マニアティスらの方法 (Maniatis, T., et al., Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) 記載) により行なうことができる。

## 【0044】

上述の通り作製された標識核酸プローブを用い、ゲノムDNAライブラリーから目的クローンをスクリーニングすることができる。該スクリーニング法としては、通常遺伝子クローニングに使用される方法であれば特に限定されないが、好適にはコロニー・ハイブリダイゼーション法 (Maniatis, T., et al., Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) 記載) を使用することができる。

## 【0045】

コロニー・ハイブリダイゼーションに用いるコロニーの培養は、各宿主細胞に適した条件下で行なうことができ、好適な宿主細胞である大腸菌の形質転換体の培養は、LB寒天培地 (1% (w/v) トリプトン、0.5% (w/v) イーストエキスト

ラクト、0.5%(w/v)塩化ナトリウム、1.5%(w/v)アガロース)上で、30乃至37℃、18時間乃至2日間保温することにより行なうことができる。

【0046】

コロニー・ハイブリダイゼーションにより得られる陽性クローンからの組換えDNAベクターの調製は、該陽性クローンの培養物からプラスミドを抽出及び精製することによりなされる。

【0047】

本発明において得られた陽性クローンである形質転換大腸菌 *E. coli* pML48 SANK71199株は、平成11年(1999年)7月7日付けで、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号の通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に国際寄託され、受託番号FERM BP-6780を付された。

【0048】

*E. coli* pML48 SANK71199株が保持する組換えDNAベクターはpML48と命名された。

【0049】

陽性クローンの保持する組換えDNAベクターが所望のML-236B生合成関連ゲノムDNAを含んでいることは、該組換えDNAベクターの挿入塩基配列の決定、サザンブロット・ハイブリダイゼーション又は機能発現により確認できる。

【0050】

DNAの塩基配列は、マキサム・ギルバートの化学修飾法 (Maxam, A.M.M. and Gilbert, W., *Methods in Enzymology*, 65, 499 (1980) 記載) 又はジデオキシヌクレオチド鎖終結法 (Messing, J. and Vieira, J., *Gene*, 19, 269 (1982) 記載) 等により決定できる。なお、塩基配列決定に供するプラスミドDNAとしては、より純度の高い標品が好ましい。

【0051】

pML48の挿入塩基配列は配列表の配列番号1に示される。配列表の配列番号2に示される塩基配列は、配列番号2に示される塩基配列に対して完全に相補的である。通常ゲノムDNAの塩基配列は同種内において遺伝的多型(ポリモル

フィズム：polymorphism)を有している。また、DNAクローニングの過程及び塩基配列決定の過程において、ヌクレオチドの置換等が一定の確率で生じ得る。従って、本発明のML-236B生合成関連ゲノムDNAは、配列表の配列番号1又は2のヌクレオチド番号1乃至34203に示される塩基配列を有するDNAにハイブリダイズするゲノムDNA、及び配列表の配列番号1又は2のヌクレオチド番号1乃至34203に示される塩基配列を有するDNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするゲノムDNAをも包含する。これらゲノムDNAとしては、配列表の配列番号1又は2のヌクレオチド番号1乃至34203に示される塩基配列に1つ以上のヌクレオチドの置換、欠失及び／又は付加が生じたもの、並びにペニシリウム・シトリナム SANK13380株以外のML-236B生産菌に由来するものであり、ML-236B生産菌内に導入されることにより該菌のML-236B生産能を改善する機能を有するものをも包含する。

#### 【0052】

ML-236B生合成関連ゲノムDNAの解析法は次の1)乃至3)に従う。

##### 1) 遺伝子解析ソフトによる解析

ゲノムDNA配列中の遺伝子領域の推定は、既存の遺伝子解析プログラム(Gene Findingプログラム(以下、「GRAIL」という。))、及び配列の相同性検索プログラム(BLASTN及びBLASTX)により行うことができる。

#### 【0053】

GRAILはゲノム配列の「遺伝子配列らしさ」を評価する7つのパラメータに分割し、それらの結果をニューラルネット法を用いて統合することにより、ゲノムDNA上の構造遺伝子を検索するプログラム(Uberbacher,E.C.& Mural,R.J.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA.,88,11261(1991)記載)であり、APOCOM GRAIL Toolkit(APOCOM社製)が好適に使用される。

#### 【0054】

BLASTは核酸配列及びアミノ酸配列の相同性検索を行なうアルゴリズム(Altechul,S.F.,Madden,T.L.,et al.,Nucl.Acids Res.,25,3389(1997)記載)を用

いたプログラムである。

【0055】

ゲノムDNA配列を適当な長さに分割し、BLASTNを用いて遺伝子データベースに対し相同性検索することにより、被検DNA配列上の構造遺伝子の位置及び方向を推定することができる。また、分割されたゲノムDNA配列を6つの翻訳フレーム（センス配列及びアンチセンス配列に各々3つずつ）に従ってアミノ酸配列に翻訳し、該アミノ酸配列のペプチド・データベースに対する相同性検索をBLASTXを用いて行なうことにより、被検DNA配列上の構造遺伝子の位置及び方向の推定を行なうこともできる。さらに、真核生物においては、ゲノムDNA配列中に含まれる構造遺伝子のコード領域がイントロン配列により分断されている場合があり、このようなギャップを有する構造遺伝子の解析にはギャップ含有配列用のBLASTがより有効であり、Gapped-BLAST (BLAST2:WISCONSIN GCG package ver. 10.0に搭載)が好適に使用される。

2) ノーザンブロット・ハイブリダイゼーション法による解析

ノーザンブロット・ハイブリダイゼーション法により、1)記載の解析法により推定される構造遺伝子の発現を調べることができる。

【0056】

ノーザンブロットに供するML-236B生産菌の全RNAは、該菌の培養物より得ることができる。好適なML-236B生産菌であるペニシリウム・シトリナムの培養は、該菌のスラントからMGB3-8培地に該菌を接種し、22乃至28℃、1乃至4日間、振盪しつつ保温することにより行うことができる。

【0057】

ML-236B生産菌からのRNAの抽出は、通常全RNAを調製するのに使用される方法であれば特に限定されないが、例えば、グアニジン・チオシアネート・ホットフェノール法、グアニジン・チオシアネート-グアニジン・塩酸法等が挙げられる。また、より純度の高い全RNAを調製するための市販キットとしては、例えば、RNeasy Plant Mini Kit (キアゲン社製)等が挙げられる。さらに、mRNAは、全RNAをオリゴ(dT)カラムに添加

し、該カラムに吸着した画分を回収することにより得ることができる。

【0058】

RNAのメンブレンへのトランスファー、プローブの調製、ハイブリダイゼーション及びシグナルの検出は、上述のサザンブロット・ハイブリダイゼーションと同様に行なうことができる。

3) 5' -末端及び3' -末端の解析

各構造遺伝子の5' -末端及び3' -末端の解析は、RACE (rapid amplification of cDNA ends) 法により行なうことができる。RACEは、mRNAを鋳型とし、塩基配列が決定されている領域から塩基配列が決定されていない5' -末端又は3' -末端領域までを含むcDNAを、RT-PCRの応用により取得する方法である (Frohman, M.A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85, 8998 (1988) 記載)。

【0059】

5' RACEは以下の方法に従う。mRNAを鋳型とし、塩基配列中の公知の部分に基いて設計されたアンチセンス側のオリゴヌクレオチドDNA (1) をプライマーとした逆転写酵素反応によりcDNA第一鎖を合成した後、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼにより該cDNA第一鎖の3' -末端にホモポリメリックな (homopolymeric: 単一塩基からなる) ヌクレオチド鎖を付加させる。該cDNA第一鎖を鋳型とし且つ該ホモポリメリックな塩基配列に相補的な塩基配列を含むセンス側のオリゴヌクレオチドDNA、及び、アンチセンス側に存在し且つオリゴヌクレオチドDNA (1) より3' -側に存在するオリゴヌクレオチドDNA (2) をプライマーとしたPCRによって、5' -末端領域の二本鎖cDNAを増幅させる方法である (Frohman, M.A., Methods in Enzymol., 218, 340 (1993) 記載)。5' RACE用のキットが市販されており、このようなキットとして、例えば、5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA ends, Version 2.0 (GIBCO社製) 等が好適に使用される。

【0060】

3' RACEは、mRNAの3' -末端に存在するポリA領域を利用する方法

である。すなわち、mRNAを鋳型として、オリゴd (T) アダプターをプライマーとした逆転写酵素反応によりcDNA第一鎖を合成した後、該cDNA第一鎖を鋳型として、塩基配列中の公知の部分に基いて設計されたセンス側のオリゴヌクレオチドDNA (3)、及び、アンチセンス側のオリゴd (T) アダプターをプライマーとしたPCRによって、3'-末端領域の二本鎖cDNAを増幅させる方法である。3' RACE用のキットが市販されており、このようなキットとして、例えば、Ready-To-Go T-primed First-Strand Kit (Pharmacia 社製) が好適に使用される。

## 【0061】

RACEにおける塩基配列中の公知の部分に基いたプライマーの設計には、上記1) 及び2) の解析結果が好適に利用できる。

## 【0062】

以上、1) 乃至3) に記載した解析法により、ゲノムDNA配列上の構造遺伝子の方向、並びに、構造遺伝子中の転写開始点の位置、翻訳開始コドンの位置、翻訳終止コドン及びその位置を推定することができる。これらの情報に基づいて、各構造遺伝子及びそのcDNA、すなわちML-236B生合成促進cDNAを取得することが可能である。

## 【0063】

本発明において得られた組換えDNAベクター pML48の挿入配列上には、6つの構造遺伝子の存在が推定され、それぞれをmlcA、mlcB、mlcC、mlcD、mlcE及びmlcRと命名した。このうち、mlcA、mlcB、mlcE及びmlcRは配列表の配列番号2に示される塩基配列上にコード領域を有し、mlcC及びmlcDは配列表の配列番号1に示される塩基配列上にコード領域を有しているものと推定された。

## 【0064】

上述の6つの構造遺伝子に対応するML-236B生合成促進cDNAを取得する方法としては、各構造遺伝子の塩基配列に基づいて設計され得るプライマーを用いたRT-PCRによるクローニング、該塩基配列に基いて得られるDNAプローブを用いたcDNAライブラリーからのクローニング等が挙げられる。ま

た、これらの方法で取得される cDNA を機能発現させるためには、完全長の cDNA を得ることが好ましい。

## 【0065】

RT-PCR による ML-236B 生合成促進 cDNA の取得について述べる。

## 【0066】

ML-236B 生合成促進 cDNA を取得するための一組の RT-PCR 用プライマーは、各鋳型鎖と選択的にアニーリングし且つ cDNA を取得するべく設計されなければならないが、この条件を満たす限りにおいて、一組の RT-PCR の一方又は双方は各鋳型鎖の一部と完全に相補的でなくてもよい。センス鎖にアニーリングする RT-PCR 用プライマー（以下、「センスプライマー」という。）としては、センス鎖の一部と完全に相補的なセンスプライマー（以下、「無置換センスプライマー」という）又はセンス鎖の一部と完全には相補的でないセンスプライマー（以下、「一部置換センスプライマー」という。）を使用することができる。アンチセンス鎖にアニーリングする RT-PCR 用プライマー（以下、「アンチセンスプライマー」という。）としては、アンチセンス鎖の一部と完全に相補的なアンチセンスプライマー（以下、「無置換アンチセンスプライマー」という）又はアンチセンス鎖の一部と完全には相補的でないアンチセンスプライマー（以下、「一部置換アンチセンスプライマー」という。）を使用することができる。

## 【0067】

センスプライマーは、それを一方のプライマーとする RT-PCR 産物が本来の位置に翻訳開始コドン atg を含み且つ該翻訳開始コドンより開始される翻訳フレーム中には本来の位置以外に翻訳終止コドンを含まないように設計される（なお、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 1 乃至 34203 に示される塩基配列及び配列表の配列番号 2 のヌクレオチド番号 1 乃至 34203 に示される塩基配列における、本発明において推定された各構造遺伝子の翻訳開始コドンの位置は、表 4 に記載されている）。

## 【0068】

無置換センスプライマーは、cDNAの翻訳開始コドンa t g中のa又はそれより5' -側の塩基を5' -末端とする。

## 【0069】

一部置換センスプライマーは、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号1乃至34203に示される塩基配列又は配列表の配列番号2のヌクレオチド番号1乃至34203に示される塩基配列上の特定の領域と選択的にアニーリングする（配列表の配列番号2の全塩基配列は、配列表の配列番号1の全塩基配列に対して完全に相補的である）。

## 【0070】

また、一部置換センスプライマーが翻訳開始コドンa t gより3' -側の塩基配列を含む場合、翻訳開始コドンa t gより3' -側の塩基配列上に開始コドンa t gから始まる翻訳フレーム中に終始コドンとなるような塩基配列（t a a、t a g又はt g a）は含まれない。なお、開始コドンa t gから始まる翻訳フレームとは、翻訳開始コドンa t gより3' -側の塩基配列を翻訳開始コドンa t gから3塩基単位に分割したときに生じる3塩基からなる配列をいう。

## 【0071】

さらに、一部置換センスプライマーが、翻訳開始コドンのa、a t又はa t g（「塩基又は塩基配列m」という。）にその位置で対応する塩基又は塩基配列（「塩基又は塩基配列m'」という。）を含む場合、塩基又は塩基配列mがaのとき、塩基又は塩基配列m'はaであり、且つ、塩基又は塩基配列m'のaは、その一部置換センスプライマーの3' -末端に位置する。塩基又は塩基配列mがa tのとき、塩基又は塩基配列m'はa tであり、且つ、塩基又は塩基配列m'のa tは、その一部置換センスプライマー4の3' -末端に位置する。塩基又は塩基配列mがa t gのとき、塩基又は塩基配列m'はa t gであり、且つ、塩基又は塩基配列m'のa t g中のaから3' -方向に数えて $3 \times n + 1$ （nは1以上の整数）番目のヌクレオチドを5' -末端とするトリヌクレオチドがその一部置換センスプライマーに存在する場合、該トリヌクレオチドの塩基配列がt a a、t a g及びt g aのいずれかであることはない。

## 【0072】



また、一部置換センスプライマーの3'-末端が、翻訳開始コドン a t g 中の a から3'-方向に数えて  $3 \times n + 1$  (nは1以上の整数) 番目のヌクレオチドであるとき、その一部置換センスプライマーを一方のプライマーとし、ML-236B生産菌のRNA若しくはmRNAを鋳型とするRT-PCR産物又はゲノムDNA若しくはcDNAを鋳型とするPCR産物において、 $3 \times n + 1$  番目のヌクレオチド及びその3'-側に隣接するジヌクレオチドからなるトリヌクレオチドの塩基配列が t a a、t a g 及び t g a のいずれかであることはない。

## 【0073】

さらに、一部置換センスプライマーのいずれか一つの3'-末端が、翻訳開始コドン a t g 中の a から3'-方向に数えて  $3 \times n + 2$  (nは1以上の整数) 番目のヌクレオチドであるとき、その一部置換センスプライマーを一方のプライマーとし、ML-236B生産菌のRNA若しくはmRNAを鋳型とするRT-PCR産物又はゲノムDNA若しくはcDNAを鋳型とするPCR産物において、 $3 \times n + 2$  番目のヌクレオチド及びその3'-側並びに5'-側に隣接する2つのモノヌクレオチドからなるトリヌクレオチドの塩基配列が t a a、t a g 及び t g a のいずれかであることはない。

## 【0074】

また、一部置換センスプライマーの3'-末端が、翻訳開始コドン a t g 中の a から3'-方向に数えて  $3 \times n + 3$  (nは1以上の整数) 番目のヌクレオチドであるとき、 $3 \times n + 1$  乃至  $3 \times n + 3$  番目のヌクレオチドからなるトリヌクレオチドの塩基配列が t a a、t a g 及び t g a のいずれかであることはない。

## 【0075】

以上がセンスプライマーの要件である。

## 【0076】

アンチセンスプライマーは、それ自体及び上述のセンスプライマーを一組のプライマーとして使用するRT-PCRにより、各構造遺伝子 (m l c A、m l c B、m l c C、m l c D、m l c E 及び m l c R) にコードされるペプチドのN末端からC末端までをコードしたcDNAを増幅できるように設計される。

## 【0077】

無置換アンチセンスプライマーは、cDNA上の翻訳終止領域附近の塩基配列に対して相補的な塩基配列を有するアンチセンスプライマーであれば特に限定されないが、好適には翻訳終止コドンの3'-末端の塩基に対して相補的な塩基又はそれより5'-側の塩基を5'-末端とする塩基配列を有し、より好適には翻訳終止コドンに対して相補的な3塩基の配列を有する（なお、本発明において推定された各構造遺伝子の翻訳終止コドン、該翻訳終止コドンの相補配列、各構造遺伝子にコードされるペプチドのC末端のアミノ酸残基、該アミノ酸残基をコードした塩基配列、並びに、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号1乃至34203に示される塩基配列及び配列表の配列番号2のヌクレオチド番号1乃至34203に示される塩基配列におけるそれらの位置は、表8乃至10に記載されている）。

## 【0078】

一部置換アンチセンスプライマーは、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号1乃至34203に示される塩基配列上又は配列表の配列番号2のヌクレオチド番号1乃至34203に示される塩基配列上の特定の領域と選択的にアニーリングする。

## 【0079】

以上がアンチセンスプライマーの要件である。

## 【0080】

また、一部置換センスプライマー及び一部置換アンチセンスプライマーは、上述の要件を満たす限りにおいて、それぞれの5'-末端に適宜塩基配列を付加させることが可能である。そのような塩基配列としては、該プライマーがPCRに使用可能であれば特に限定されないが、例えば、PCR産物についてその後のクローニング操作を行なうのに便利な塩基配列等が挙げられ、このような塩基配列として、制限酵素認識配列及び該制限酵素認識配列を含む塩基配列が挙げられる。

## 【0081】

さらに、センスプライマー及びアンチセンスプライマーの設計は、前述のPCR用プライマーの設計に関する記述に従って行なう。

## 【0082】

上述の通り、RT-PCRの鋳型には、ML-236B生産菌のmRNA又は全RNAを使用する。本発明においては、pML48挿入配列中に存在する構造遺伝子m1cRのコード領域全域を増幅できるような一組のプライマー（それぞれの塩基配列は、配列表の配列番号35及び36参照）を設計及び合成し、SANK13380の全RNAを鋳型してRT-PCRを行うことにより、構造遺伝子m1cRに対応するML-236B生合成促進cDNAが得られた（以下、「ML-236B生合成促進cDNA（R）」という。）。

## 【0083】

また、上述の通り、RT-PCR産物を適当なDNAベクターに組込むことにより、該RT-PCR産物をクローニングすることができる。そのようなクローニングに用いるDNAベクターとしては、通常DNA断片をクローニングするのに使用されるDNAベクターであれば特に限定されない。RT-PCR産物のクローニングを簡便に行なうキットが市販されており、このようなキットとして、例えば、Original TA Cloning Kit (Invitrogen製：DNAベクターとしてpCR2.1を使用している。)が好適に使用される。

## 【0084】

このようにして取得されるML-236B生合成促進cDNAがML-236B生産菌内で機能発現し得ることは、該cDNAをML-236B生産菌体内での機能発現に適したDNAベクターに組換え、その組換えDNAベクターで細胞を形質転換し、該形質転換細胞及び宿主細胞のML-236B生合成能を比較することにより確認できる。すなわち、ML-236B生合成促進cDNAが形質転換細胞内で機能発現していれば、該形質転換細胞のML-236B生合成能が宿主細胞のそれよりも改善されている。

## 【0085】

ML-236B生産菌体内での機能発現に適したDNAベクター（以下、「機能発現ベクター」という。）としては、ML-236B生産菌を形質転換することができ、且つML-236B生合成促進cDNAの塩基配列に対応するアミノ

酸配列を有するポリペプチドをML-236B生産菌体内で機能発現させることができ、且つ宿主細胞内で安定に保持され、且つ宿主細胞内で複製されるのに必要な塩基配列を有しているものであれば、特に限定されない。

【0086】

また、機能発現ベクターは、ML-236B生合成促進cDNA(R)を2つ以上含有してもよい。

【0087】

さらに、機能発現ベクターは、ML-236B生合成促進cDNA(R)以外のDNAのうち、ML-236B生産菌に導入されることによりML-236Bの生合成を促進するものを2種以上、それぞれ2つ以上含有してもよい。そのようなDNAとしては、例えば、mlcA、mlcB、mlcC、mlcD又はmlcEに対応するcDNA、ML-236B生合成関連ゲノムDNA又は本発明のML-236B生合成促進cDNAの発現調節因子をコードしたDNA等が挙げられる。

【0088】

また、機能発現ベクターは、宿主細胞に表現型の選択性を付与する塩基配列を有していること、及びシャトルベクターであることが、それぞれ好ましい。

【0089】

さらに、宿主細胞に付与され得る表現型の選択性としては、薬剤耐性等が挙げられ、好適には抗生物質耐性、より好適にはアンピシリン耐性、ハイグロマイシンB耐性である。

【0090】

また、機能発現ベクターがシャトルベクターである場合、一方の微生物群の宿主細胞において複製されるのに必要な塩基配列を有し、且つ他方の宿主細胞において挿入配列にコードされたポリペプチドを機能発現させるのに必要な塩基配列を有していなければならない。また、形質転換される複数の微生物群の宿主にそれぞれ異なった表現系の選択性を付与する塩基配列を有していることが好ましい。複数の微生物群の組み合わせは、本明細書中に記載されたML-236B生合成関連ゲノムDNAのクローニング及び機能発現に使用されるシャトルベクター

の要件に準ずる。本発明においては、このようなシャトルベクターとして、DNAベクター pSAK333（特開平3-262486号公報記載）に、該DNAベクター上に存在するアスペルギルス・ニデュランス由来の3-ホスホグリセレートキナーゼ（3-phosphoglycerate kinase：以下、「pgk」という。）遺伝子プロモータ、外来遺伝子挿入用のアダプター、及び該DNA上に存在するpgkターミネータを、この順で組込むことにより作製されたDNAベクター pSAK700（図4参照）が好適に使用される。

## 【0091】

上述のような機能発現ベクターに、上述のML-236B生合成促進cDNAを組込むことにより、該cDNAの塩基配列に対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドをML-236B生産菌体内で機能発現させることができる。本発明においては、ML-236B生合成促進cDNA（R）をpSAK700のアダプター部位に挿入することにより、組換えcDNA発現ベクター、pSAKexpRが得られた。pSAKexpRの挿入配列、すなわちML-236B生合成促進cDNA（R）の塩基配列は、配列表の配列番号37に記載した。

## 【0092】

なお、pSAKexpRで形質転換された大腸菌株 E. coli pSAKexpR SANK 72599は、平成12年（2000年）1月25日付けで通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東町1丁目1番3号）に国際寄託され、受託番号FERM BP-7006を付された。

## 【0093】

ML-236B生合成促進cDNA、ML-236B生合成関連ゲノムDNA、又はそれらの断片を機能発現させるための形質転換法は、宿主細胞により適宜選択される。好適なML-236B生産菌でペニシリウム・シトリナムの形質転換は、ペニシリウム・シトリナムの孢子からプロトプラストを調製し、該プロトプラストに組換えDNAベクターを導入することにより行なうことができる（Nara, F., et al., Curr. Genet. 23, 28 (1993) 記載）。

## 【0094】

ペニシリウム・シトリナムを培養したスラントからPGA寒天培地のプレートへ該菌を接種し、22乃至28℃、10乃至14日間保温し、該プレートから胞子を回収し、該胞子 $1 \times 10^7$ 乃至 $1 \times 10^9$ 個を50乃至100mlのYPL-20培地（組成；0.1% (w/v) イーストエキストラクト（Difco社製）、0.5% (w/v) ポリペプトン（日本製薬（株）製）、20% (w/v) ラクトース、pH 5.0）に接種し、22乃至28℃、18時間乃至2日間保温する。該培養物から発芽胞子を回収し、細胞壁分解酵素で処理し、プロトプラストを得る。細胞壁分解酵素としては、ペニシリウム・シトリナムの細胞壁を分解するものであり且つ該菌に有害な作用を及ぼさないものであれば特に限定されないが、例えば、ザイモリアーゼ、キチナーゼ等が挙げられる。

## 【0095】

ML-236B生産菌又はそのプロトプラストに、ML-236B生合成促進cDNAを挿入した組換えDNAベクターを接触させると、該DNAベクターがプロトプラストの中に取り込まれ、形質転換体を得られる。

## 【0096】

ML-236B生産菌の形質転換体の培養は、各宿主細胞に適した条件下で行なうことができるが、好適なML-236B生産菌であるペニシリウム・シトリナムの形質転換体の場合は、予め形質転換させたプロトプラストを適当な条件下で培養することにより細胞壁を再生させ、その後培養する。すなわち、形質転換されたペニシリウム・シトリナムのプロトプラストを封入したVGS中層寒天培地（組成；Vogel最小培地、2% (w/v) グルコース、1Mグルシトール、2% (w/v) 寒天）をVGS下層寒天培地（組成；Vogel最小培地、2% (w/v) グルコース、1Mグルシトール、2.7% (w/v) 寒天）及びVGS上層寒天培地（組成；Vogel最小培地、2% (w/v) グルコース、1Mグルシトール、1.5% (w/v) 寒天）で挟み、22乃至28℃、7乃至15日間保温することにより行なうことができる。得られた菌株はPGA培地上で、22乃至28℃で保温しつつ継代培養する。該菌株をPGA培地で作製したスラントに白金耳を用いて接種し、22乃至28℃、10乃至14日間保温し、0乃至4℃で保存する。

## 【0097】

上述の通り細胞壁を再生させたペニシリウム・シトリナムの形質転換体を培養したスラントから、MBG3-8培地へ該形質転換体を接種し、22乃至28℃、7乃至12日間、振盪しつつ保温することにより、ML-236Bを効率よく生産することができる。なお、宿主細胞のペニシリウム・シトリナムについても、全く同様の液体培養によりML-236Bを生産させることができる。

## 【0098】

ML-236B生産菌の形質転換体の培養物からのML-236Bの精製は、通常天然物の精製に使用される諸技法を組み合わせることによりなされる。該諸技法としては、特に限定されないが、例えば、遠心分離、濾過による固液分離、アルカリ又は酸処理、有機溶媒による抽出、転溶、吸着及び分配等の各種クロマトグラフィー、結晶化等が挙げられる。ML-236Bは、ヒドロキシ酸体とラクトン体の両方の形をとり、相互に変換し、更に、ヒドロキシ酸体は安定な塩を形成する。このような物理化学的特質を利用して、ML-236Bのヒドロキシ酸体（以下、「遊離型ヒドロキシ酸」という。）、ML-236Bのヒドロキシ酸塩（以下、「ヒドロキシ酸塩」という。）、又はML-236Bのラクトン体（以下、「ラクトン」という。）を得ることができる。

## 【0099】

該培養物を、加熱下又は常温下でアルカリ加水分解することにより開環し、ヒドロキシ酸塩に変換し、該反応溶液を酸性にした後濾過し、濾液を水と混和しない有機溶媒で抽出することにより、目的化合物を遊離型ヒドロキシ酸として得ることができる。水と混和しない有機溶媒としては、特に限定されるものではないが、例えば、ヘキサン、ヘプタン等の脂肪族炭化水素類、ベンゼン、トルエン等の芳香族炭化水素類、メチレンクロリド、クロロホルム等のハロゲン化炭化水素類、ジエチルエーテル等のエーテル類、蟻酸エチル、酢酸エチル等のエステル類、それら2種以上の混合溶媒等が挙げられる。

## 【0100】

また、この遊離型ヒドロキシ酸を、水酸化ナトリウム等のアルカリ金属塩類の水溶液に転溶することにより、目的化合物をヒドロキシ酸塩として得ることができる。

## 【0101】

さらに、この遊離型ヒドロキシ酸を、有機溶媒中で加熱して脱水するか、又は他の方法により閉環することにより、目的化合物をラクトンとして得ることができる。

## 【0102】

このようにして得ることができる遊離型ヒドロキシ酸、ヒドロキシ酸塩及びラクトンは、カラムクロマトグラフィー等により精製、単離することが可能である。カラムクロマトグラフィーの担体としては、特に限定されるものではないが、例えば、セファデックス LH-20 (Pharmacia 社製)、ダイヤイオン HP-20 (三菱化学 (株) 製)、シリカゲル、逆相系担体等が挙げられ、好適には C18 系の担体である。

## 【0103】

ML-236B の定量法としては、通常有機化合物の定量に用いられる方法であれば特に限定されないが、例えば、逆相高性能クロマトグラフィー (reverse phase high performance liquid chromatography: 以下、「逆相 HPLC」という。) 法等が挙げられる。逆相 HPLC 法による定量は、ML-236B 生産菌の培養物をアルカリ加水分解し、可溶性画分を C18 カラムを用いた逆相 HPLC に供し、紫外吸収を測定し、該吸収を定量化することにより行なうことができる。C18 カラムとしては、通常の逆相 HPLC に使用される C18 カラムであれば特に限定されないが、例えば、SSC-ODS-262 (直径 6 mm、長さ 100 mm: センシユー科学 (株) 製) 等が挙げられる。移動相としては、通常逆相 HPLC に使用される溶媒であれば特に限定されないが、例えば、75% (v/v) メタノール-0.1% (v/v) トリエチルアミン-0.1% (v/v) 酢酸等が挙げられる。移動相に流速 2 ml/分の 75% (v/v) メタノール-0.1% (v/v) トリエチルアミン-0.1% (v/v) 酢酸を用いて SSC-ODS-262 カラムに ML-236B を室温で添加すると、4.0 分後に溶出される。ML-236B の検出は、HPLC 用 UV 検出器を用いて行なうことができ、UV 検出器の吸収波長は、220 乃至 280 nm であり、好適には 220 乃至 260 nm、より好適には 236 nm であ



る。

【0104】

なお、本明細書においては、アデニンを「a」、グアニンを「g」、チミンを「t」、シトシンを「c」とそれぞれ記載する。配列表の各配列番号に示される塩基配列は、「塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン（特許庁公表、平成10年6月）」に従って記載した。

【0105】

【実施例】

以下に実施例を挙げ、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0106】

実施例1. pSAKcos1ベクターの作製

1) 大腸菌由来のハイグロマイシンBホスフォトランスフェラーゼ遺伝子 (hygromycin B phosphotransferase gene: 以下、「HPT」という。) を含有するプラスミド pSAK333 (特開平3-262486号公報記載) を制限酵素 BamHI (宝酒造(株)製) で消化し、T4DNAポリメラーゼ (宝酒造(株)製) で末端を平滑化した。

2) DNA ligation kit Ver. 2 (宝酒造(株)製) を用いて上記DNA断片を自己環状化し、大腸菌のコンピテント・セル JM109株 (宝酒造(株)製) を形質転換した。形質転換大腸菌から BamHI 部位を欠失したプラスミドを保有する株を選抜し、この株が保有するプラスミドを pSAK360 と命名した。

3) pSAK360 を制限酵素 Pvu2 で消化した後、アルカリフォスファターゼ処理を行い、5'末端の脱リン酸化を行なった。コスミドベクター pWE15 (STRATAGENE社製) からコス(cos)部位を含む [Sal1-Sca1] 断片 (約3kb) を取得し、T4DNAポリメラーゼにより末端を平滑化した後、pSAK360のPvu2部位に連結し、JM109株を形質転換した。該形質転換大腸菌から [Sal1-Sca1] 断片 (約3kb) を Pvu2

部位に挿入したプラスミドを保有する株を選抜し、この株が保有するプラスミドを pSAKcos1 と命名した。pSAKcos1 は、pWE15 由来の BamHI、EcoRI 及び NotI の各制限酵素認識部位を1つずつ有する。また、pSAKcos1 は選択マーカーとして、アンピシリン耐性遺伝子及びハイグロマイシン耐性遺伝子を有している。以下の実施例において、大腸菌を宿主とする場合、pSAKcos1 又は外来DNAを挿入した pSAKcos1 による形質転換体の選択は、40  $\mu$ g/ml のアンピシリン (Ampicillin: Sigma 社製) を培地に添加して行なった。ペニシリウム・シトリナム SANK13380 を宿主とする場合、pSAKcos1 又は外来DNAを挿入した pSAKcos1 による形質転換体の選択は、200  $\mu$ g/ml のハイグロマシシンB (hygromycin B: Sigma 社製) を培地に添加して行なった。

【0107】

pSAKcos1 の構築手順を図1に記載した。

実施例2. ペニシリウム・シトリナム SANK13380 株のゲノムDNAの調製

1) ペニシリウム・シトリナム SANK13380 株の培養

ペニシリウム・シトリナム SANK13380 株の種菌の培養はPGA寒天培地を用いたスラントにて行なった。すなわち、ペニシリウム・シトリナム SANK13380 株を白金耳により接種し、26℃にて14日間保温した。このスラントは4℃で保存した。

【0108】

本培養は、液体通気培養にて行なった。上述のスラント5mm角の菌体を50mlのMBG3-8培地を入れた500ml容の三角フラスコに接種し、26℃、210rpmの条件下で5日間振盪培養した。

2) ペニシリウム・シトリナム SANK13380 株の培養物からのゲノムDNAの調製

1) の培養物を、室温、1000×Gの条件下で10分間遠心分離し、菌体を回収した。湿重量3gの菌体を、ドライアイスで冷却した乳鉢上で粉末になるま

で破碎した。菌体破碎物を20mlの62.5mM EDTA・2Na（和光純薬（株）製）-5%（w/v）SDS-50mM Tris（和光純薬（株）製）-塩酸（和光純薬（株）製）緩衝液（pH8.0）で満たした遠心管に入れ、穏やかに混合した後、0℃にて1時間静置した。10mM Tris-塩酸-0.1mM EDTA・2Na（pH8.0：以下「TE」という。）で飽和した10mlのフェノールを添加し、50℃にて1時間穏やかに攪拌した。室温、10000×Gの条件下で10分間遠心分離した後、15mlの上層（水相）を別の遠心管にとり、0.5倍容のTE飽和フェノール及び0.5倍容のクロロホルム溶液を加え、2分間穏やかに攪拌した後、室温、10000×Gの条件下で10分間遠心分離した（以下、「フェノール・クロロホルム抽出」という。）。10mlの上層（水相）に10mlの8M 酢酸アンモニウム（pH7.5）及び25mlの2-プロパノール（和光純薬（株）製）を添加し、-80℃にて15分間冷却した後、4℃、10000×Gの条件下で10分間遠心分離した。沈澱を5mlのTEに溶解させた後、20μlの10mg/mlリボヌクレアーゼA（Sigma社製）及び250単位のリボヌクレアーゼT1（GIBCO社製）を添加し、37℃にて20分間保温した。これに20mlの2-プロパノールを添加し、穏やかに混合した後、糸状のゲノムDNAをパスツールピペットの先端に巻きつけ、1mlのTEに溶解させた。このDNA溶液に0.1倍容の3M 酢酸ナトリウム（pH6.5）及び2.5倍容のエタノールを加え、-80℃にて15分冷却した後、4℃、10000×Gの条件下で5分間遠心分離した（以下、「エタノール沈澱」という。）。得られた沈澱を200μlのTEに溶解し、ゲノムDNA画分とした。

### 実施例3. ペニシリウム・シトリナム SANK13380株のゲノムDNAライブラリーの作製

#### 1) ゲノムDNA断片の調製

実施例2において得られたペニシリウム・シトリナム SANK13380株のゲノムDNA（50μg）を含む100μlの水溶液に、0.25単位のSau3A1（宝酒造（株）製）を添加した後、10、30、60、90及び120

秒経過後に  $20\mu\text{l}$  ずつサンプリングし、各サンプルに  $20\mu\text{l}$  ずつの  $0.5\text{M}$  EDTA (pH 8.0) を加えて制限酵素反応を停止した。アガロースゲル電気泳動により、得られた部分消化 DNA 断片を分離し、 $30\text{kb}$  以上の大きさをもつ DNA 断片を含むアガロースゲルを回収した。

#### 【0109】

回収したゲルを細かく碎き、ウルトラフリー C3 遠心式ろ過ユニット (日本ミリポア (株) 製) に入れた。  $-80^{\circ}\text{C}$  にて 15 分間冷却し、ゲルを凍結した後、  $37^{\circ}\text{C}$  にて 10 分間保温してゲルを融解した。  $5000\times\text{G}$ 、5 分間遠心分離し、DNA 抽出液を得た。この DNA 抽出液について、フェノール・クロロホルム抽出及びエタノール沈澱を行ない、得られた沈澱を少量の TE に溶解した。

#### 2) DNA ベクター pSAKcos1 の前処理

pSAKcos1 を制限酵素 BamHI (宝酒造 (株) 社製) により消化した後、  $65^{\circ}\text{C}$  にて 30 分間アルカリフォスファターゼ (宝酒造 (株) 製) 反応を行った。反応終了液について、フェノール・クロロホルム抽出及びエタノール沈澱を行ない、得られた沈澱を少量の TE に溶解した。

#### 3) ライゲーション及び in vitro パッケージング

上記 1) 記載のゲノム DNA 断片 ( $2\mu\text{g}$ ) 及び上記 2) 記載の前処理済み pSAKcos1 ( $1\mu\text{g}$ ) を混合し、DNA ligation kit Ver. 2 (宝酒造 (株) 製) を用い、  $16^{\circ}\text{C}$  にて 16 時間ライゲーション反応を行った。反応終了液について、フェノール・クロロホルム抽出及びエタノール沈澱を行ない、得られた沈澱を  $5\mu\text{l}$  の TE に溶解させた。ライゲーション生成物溶液を、GIGAPAK II Gold (STRATAGENE 社製) キットを用いた in vitro パッケージングに供し、組換え DNA ベクターを含む形質転換大腸菌を得た。形質転換大腸菌のコロニーを形成させたプレートに  $3\text{ml}$  の LB 培地を注ぎ、セルスクレーパーを用いてプレート上のコロニーを回収した (回収液 1 という)。さらに  $3\text{ml}$  の LB 培地でプレートを洗浄、回収した (回収液 2 という。)。回収液 1 及び 2 の混合液にグリセリンを終濃度  $18\%$  となるよう加えたものを大腸菌菌体液と称し、ペニシリウム・シトリナム SANK 13380 株のゲノム DNA ライブラリーとして、  $-80^{\circ}\text{C}$  にて保存した。

実施例 4. ペニシリウム・シトリナム SANK 1 3 3 8 0 株のゲノム DNA を  
鋳型とした PCR による P K S 遺伝子断片の増幅

1) PCR 用プライマーの設計及び合成

アスペルギルス・フラヴァス (*Aspergillus flavus*) の P K S 遺伝子のアミノ  
酸配列 (Brown, D. W., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 1418 (1996) 記載) に基  
づき、配列表の配列番号 3 及び 4 に示されるミックス・プライマーを設計及び合  
成した。該合成はホスフォロアミダイト法により行った。

【 0 1 1 0 】

配列表の配列番号 3 : gayacngcntgyasttc

配列表の配列番号 4 : tcncnknrcwgtgncc

なお、配列表の配列番号 3 及び 4 に示される塩基配列において、n はイノシン  
の塩基 (ヒポキサンチン) を、y は t 又は c を、s は g 又は c を、k は g 又は t を、r は g  
又は a を、w は a 又は t を、それぞれ表わす。

2) PCR による DNA 断片の増幅

上記 2) 記載の PCR 用プライマー (各 1 0 0 p m o l)、実施例 2 で得られ  
たペニシリウム・シトリナム SANK 1 3 3 8 0 株のゲノム DNA (5 0 0 n  
g)、0. 2 m M d A T P、0. 2 m M d C T P、0. 2 m M d G T P、  
0. 2 m M d T T P、5 0 m M 塩化カリウム、2 m M 塩化マグネシウム及  
び 1. 2 5 単位の Ex. T a q DNA ポリメラーゼ (宝酒造 (株) 製) を含む  
5 0 μ l の反応液を、9 4 ° C にて 1 分間、5 8 ° C にて 2 分間、7 0 ° C にて 3 分間  
、の連続する 3 工程からなるサイクル反応に供した。このサイクルを 3 0 回繰り  
返すことにより DNA 断片を増幅した。PCR は、T a K a R a PCR Th  
ermal Cycler MP TP 3 0 0 0 (宝酒造 (株) 製) を使用して  
行なった。

【 0 1 1 1 】

増幅された DNA 断片を、アガロースゲル電気泳動に供した後、約 1. 0 乃至  
2. 0 k b の大きさをもつ DNA 断片を含むアガロースゲルを回収した。ゲルか  
ら DNA を回収し、フェノール・クロロホルム抽出及びエタノール沈澱を行ない

、得られた沈澱を少量のTEに溶解した。

### 3) ライゲーション及び形質転換

2) で得られたDNA断片、及び、TAクローニング・システムpCR2.1 (Invitrogen社製) を用いて、このキットに含まれるプラスミドpCR2.1にライゲーションし、形質転換株を得た。

#### 【0112】

得られたクローンを数個選び、マニアティスら (Maniatis, T., et al., Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) 記載) の方法に従って培養した。すなわち、2 ml のLB培地を含む24 ml 容の試験管に各コロニーを接種し、37℃にて18時間、振盪培養した。

#### 【0113】

この培養物からの組換えDNAベクターの調製は、アルカリ法 (Maniatis, T., et al., Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) 記載) に従った。すなわち、1.5 ml の培養液を、室温、10000×Gの条件下で2分間遠心分離し、沈澱より菌体を回収した。菌体に100 µl の50 mM グルコース-25 mM Tris-塩酸-10 mM EDTA (pH 8.0) を加えて懸濁し、200 µl の0.2 規定水酸化ナトリウム-1% (w/v) SDSを加えて穏やかに攪拌し、溶菌させた。これに150 µl の3M 酢酸カリウム-11.5% (w/v) 氷酢酸を加えてタンパク質を変性させ、室温、10000×Gの条件下で10分間遠心分離し、上清を回収した。上清について、フェノール・クロロホルム抽出及びエタノール沈澱を行ない、得られた沈澱を40 µg/ml のリボヌクレアーゼA (Sigma社製) を含有する50 µl のTEに溶解させた。

#### 【0114】

各組換えDNAベクターを制限酵素消化して電気泳動に供し、電気泳動パターンの異なる組換えDNAベクター中の挿入塩基配列を、DNAシーケンサー (モデル377: パーキンエルマー・ジャパン社製) を用いて決定した。

#### 【0115】

その結果、P K S 遺伝子断片を含む組換えDNAベクターを保有する株の存在が確認された。

【0 1 1 6】

実施例 5. ペニシリウム・シトリナム SANK13380株のゲノミック・サザンブロットハイブリダイゼーション

1) 電気泳動及びメンブレンへのトランスファー

実施例 2 において得られたのペニシリウム・シトリナム SANK13380株のゲノムDNA (10  $\mu$ g) を、制限酵素EcoRI、SalI、Hind3又はSacI (いずれも宝造(株)製) を用いて消化し、アガロースゲル電気泳動に供した。アガロースゲルの調製には、Agarose L03「TAKARA」(宝酒造(株)製) を用いた。泳動後、ゲルを0.25規定塩酸(和光純薬(株)製) に浸し、室温にて10分間穏やかに振盪した。このゲルを0.4規定水酸化ナトリウム(和光純薬(株)製) 中に移し、室温にて30分間穏やかに振盪した。マニアティスらのアルカリトランスファー法(Maniatis, T., et al., Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) 記載) により、ゲル中のDNAをナイロン・メンブレンHybondTM-N+ (アマシャム社製) にトランスファーし、固定した。メンブレンを2×SSC (1×SSCの組成は、150mM NaCl、1.5mM クエン酸三ナトリウム) で洗浄した後風乾した。

2) ハイブリダイゼーション及びシグナルの検出

1) で得られたメンブレンに対し、実施例 4 で得られたP K S 遺伝子断片をプローブとして用いたハイブリダイゼーションを行なった。

【0 1 1 7】

プローブには、実施例 4 において得られたP K S 遺伝子断片DNA (1  $\mu$ g) をDIG DNA Labelling Kit (ベーリンガー・マンハイム社製) で標識し、使用直前に10分間煮沸後急冷したものを用いた。

【0 1 1 8】

ハイブリダイゼーション液 (DIG イージーハイブ: ベーリンガー・マンハイ

ム社製)に1)記載のメンブレンを浸し、20rpmで振盪しつつ、42℃にて2時間ハイブリダイゼーションを行なった後、上述の標識プローブをハイブリダイゼーション液に添加し、マルチシェーカー・オープンHB(TAITEC社製)を用い、20rpmで振盪しつつ42℃にて18時間ハイブリダイゼーションを行なった。ハイブリダイゼーションを行なったメンブレンについて、2×SSCを用いた室温、20分間の洗浄を3回、0.1×SSCを用いた55℃、30分間の洗浄を2回、それぞれ行なった。

【0119】

洗浄したメンブランをDIG Luminescent Detection Kit for Nucleic Acids(ベーリンガー・マンハイム社製)で処理し、X線フィルム(ルミフィルム:ベーリンガー・マンハイム社製)に露光した。感光は富士メディカルフィルムプロセサーFPM800A(Fuji Film社製)を用いて行なった。

【0120】

その結果、実施例4において得られたPKS遺伝子断片はペニシリウム・シトリナムのゲノム上に存在することが確認された。

【0121】

実施例6. PKS遺伝子断片をプローブとしたペニシリウム・シトリナム SANK13380株のゲノムDNAライブラリーのスクリーニング

PKS遺伝子を含むゲノムDNAのクローニングは、コロニーハイブリダイゼーション法により行なった。

1) メンブレンの調製

ペニシリウム・シトリナム SANK13380株のゲノムDNAライブラリーとして保存した大腸菌菌体液(実施例3記載)を、LB寒天培地のプレートに、プレート1枚あたり5000乃至10000個のコロニーが生育するよう希釈して撒いた。このプレートを26℃にて18時間保温した後、4℃にて1時間冷却した。Hybond™-N<sup>+</sup>(アマシャム社製)をプレートにのせ、1分間接触させた。コロニーを付着させたメンブレンをプレートから注意深く離し、コ



ロニー接触面を上にして、200mlの1.5M 塩化ナトリウム-0.5規定水酸化ナトリウムに7分、200mlの1.5M 塩化ナトリウム-0.5M Tris-塩酸-1mM EDTA (pH7.5)に3分ずつ2回浸した後、400mlの2×SSCで洗浄した。洗浄したメンブレンを30分風乾した。

## 2) ハイブリダイゼーション

プローブには、実施例4において得られたPKS遺伝子断片DNA (1μg)をDIG DNA Labelling Kit (ベーリンガー・マンハイム社製)で標識し、使用直前に10分間煮沸後急冷したものを用いた。

### 【0122】

ハイブリダイゼーション液 (DIGイーザーハイブ:ベーリンガー・マンハイム社製)に1)記載のメンブレンを浸し、20rpmで振盪しつつ、42℃にて2時間プレハイブリダイゼーションを行なった後、上述の標識プローブをハイブリダイゼーション液に加え、マルチシェーカー・オーブンHB (TAITEC社製)を用い、20rpmで振盪しつつ42℃にて18時間ハイブリダイゼーションを行なった。ハイブリダイゼーションを行なったメンブレンについて、2×SSCを用いた室温、20分間の洗浄を3回、0.1×SSCを用いた68℃、30分間の洗浄を2回、それぞれ行なった。

### 【0123】

洗浄したメンブレンをDIG Luminescent Detection Kit for Nucleic Acids (ベーリンガー・マンハイム社製)で処理し、X線フィルム (ルミフィルム:ベーリンガー・マンハイム社製)に露光した。感光は富士メディカルフィルムプロセサーFPM800A: Fuji Film社製)を用いて行なった。

### 【0124】

以上、1)及び2)記載の操作をスクリーニングという。

### 【0125】

一回目のスクリーニングで陽性シグナルが検出されたクローンのコロニー周辺をかきとってLB培地に懸濁した後、適宜希釈してプレートに撒いて培養し、同様に二回目のスクリーニングを行ない、陽性クローンを純化した。

【0126】

なお、本実施例で得られた陽性クローン、すなわち形質転換大腸菌 *E. coli* pML48 SANK71199は、平成11年（1999年）7月7日付けで通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東町1丁目1番3号）に国際寄託され、受託番号FERM BP-6780を付された。

【0127】

実施例7. 組換えDNAベクターpML48の挿入配列の解析（1）

実施例6で得られた*E. coli* pML48 SANK71199株の培養及び該培養物からの組換えDNAベクターの調製は、実施例4記載の方法に準じて行なった。

【0128】

得られた組換えDNAベクターをpML48と命名した。pML48挿入配列を各種制限酵素消化し、pUC119（宝酒造（株）製）に組込むことにより、サブクロニングした。得られたサブクローンをプローブとして、実施例5記載の方法に準じてサザンブロット・ハイブリダイゼーションを行なった。すなわち、pML48の各種制限酵素消化物を電気泳動に供し、DNAをメンブレンへトランスファーしたのに対して、ハイブリダイゼーションを行なった。

【0129】

その結果、pML48挿入配列の制限酵素地図が作成された。

【0130】

また、上述の各サブクローンの挿入配列の塩基配列を、DNAシーケンサーモデル377（パーキンエルマー・ジャパン社製）を用いて決定し、pML48の全塩基配列を決定した。

【0131】

pML48の挿入配列は全34203塩基であった。

【0132】

pML48の挿入配列の塩基配列は、配列表の配列番号1及び2に記載されて

いる。配列表の配列番号 1 及び 2 に示される塩基配列は、互いに、完全に相補的である。

【0133】

該挿入配列上の構造遺伝子の存在について、遺伝子検索プログラム GRAIL (ApoCom GRAIL Toolkit: APOCOM社製) 及び相同性検索プログラム BLAST (Gapped-BLAST (BLAST2): WISCONSIN GCG package ver. 10.0 に搭載) を用いて解析した。

【0134】

その結果、pML48 の挿入塩基配列中には、6 種類の異なる構造遺伝子の存在が推定され、それぞれを m1cA、m1cB、m1cC、m1cD、m1cE 及び m1cR と命名した。また、m1cA、m1cB、m1cE 及び m1cR は配列表の配列番号 2 記載の塩基配列中に、m1cC 及び m1cD は配列表の配列番号 1 に示される塩基配列中に、それぞれコード領域を有していることが推定された。さらに、該挿入配列における各推定構造遺伝子の相対的位置及び大きさが推定された。

【0135】

本実施例の結果を図 2 に記載した。

実施例 8. 組換え DNA ベクター pML48 の挿入配列の解析 (2)

ノーザンブロット・ハイブリダイゼーション法及び RACE により、実施例 7 において存在が示唆された構造遺伝子の発現解析、及び 5' - 末端並びに 3' - 末端領域の解析を行なった。

1) ペニシリウム・シトリナム SANK13380 の全 RNA の調製

ペニシリウム・シトリナム SANK13380 株を培養したスラント (実施例 2 記載) より 5 mm 角の菌体を 10 ml の MGB3-8 培地を入れた 100 ml 容の三角フラスコに接種し、26℃にて 3 日間、振盪培養した。

【0136】

培養物からの全 RNA の調製は、グアニジン・イソチオシアネート法を利用し

たRNeasy Plant Mini Kit (キアゲン社製) を用いて行った。すなわち、培養物を、室温、 $5000\times G$ の条件下で10分間遠心分離して菌体を回収し、湿重量2gの菌体を液体窒素により凍結した後、乳鉢上で粉末になるまで破碎した。この破碎物をグアニジン・イソチオシアネートを含む4mlの菌体溶解バッファー (このキットに含まれる。) に懸濁した。懸濁液をこのキットに含まれるQIAshredderスピncラム10本に $450\mu l$ ずつ分注し、室温、 $1000\times G$ 、10分間遠心分離した後、溶出液をそれぞれ回収した: 各溶出液に $225\mu$ ずつのエタノールを加えた後、このキットに含まれるRNAミニスピncラムに添加した。このラムをこのキットに含まれる洗浄用緩衝液で洗浄した後、 $50\mu l$ ずつのリボヌクレアーゼ・フリー蒸留水で吸着物を溶出させ、溶出液を全RNA画分とした。

## 2) ノーザンブロット・ハイブリダイゼーション

$20\mu g$ のペニシリウム・シトリナム SANK13380の全RNAを含む $2.25\mu l$ の水溶液に、 $1\mu l$ の $10\times MOPS$  (組成;  $200mM$  3-モルフォリノプロパンスルホン酸、 $50mM$  酢酸ナトリウム、 $10mM$  EDTA $\cdot 2Na$ 、 $pH7.0$ :  $121^{\circ}C$ にて20分間オートクレーブ滅菌してから使用した。: 同仁化学研究所 (株) 製)、 $1.75\mu l$ のホルムアルデヒド及び $5\mu l$ のホルムアミドを添加して混合し、RNAサンプルとした。このRNAサンプルを、 $65^{\circ}C$ にて10分間保温した後、氷水中で急冷し、アガロースゲル電気泳動に供した。電気泳動のゲルは、 $10ml$ の $10\times MOPS$ 及び1gのAgarose L03「TAKARA」 (宝酒造 (株) 製) を $72ml$ のピロカルボニック・アシッド・ジエチルエステル (Sigma社製) 処理水に混合し、加熱してアガロースを溶解させた後冷却させ、 $18ml$ のホルムアルデヒドを添加することにより作製した。サンプルバッファーは、 $1\times MOPS$  ( $10\times MOPS$ を水で10倍希釈したもの。) を使用した。ゲル中のRNAを、 $10\times SSC$ 中でHybondTM-N<sup>+</sup> (アマシャム社) ヘトランスファーした。

【0137】

プローブには、pML48挿入配列を下記表1記載の制限酵素1及び2で消化することにより得られるDNA断片 (a、b、c、d及びe) を用いた。

【0138】

【表1】

ノーザンブロット・ハイブリダイゼーションのプロープ

プロ ープ	制限 酵素1	制限酵素認識部位の ヌクレオチド番号*	制限 酵素2	制限酵素認識部位の ヌクレオチド番号*
a	EcoRI	6319～6324	EcoRI	15799～15804
b	BamHI	16793～16798	PstI	18164～18169
c	KpnI	26025～26030	BamHI	27413～27418
d	SalI	28691～28696	SalI	29551～29556
e	HindIII	33050～33055	SacI	34039～34044

\*各ヌクレオチド番号は、配列表の配列番号1に基づく。

プローブの標識、ハイブリダイゼーション及びシグナルの検出は、実施例5のサザンブロット・ハイブリダイゼーションに従って行なった。

【0139】

本実施例の結果を図3に記載した。

【0140】

各シグナルは各プローブの塩基配列と相同な転写産物の存在を示す。

【0141】

本実施例でpML48挿入配列上に存在が推定された6つの構造遺伝子のうち、mlcB、mlcD、mlcE及びmlcRはペニシリウム・シトリナム SANK13380株内で転写されていることが確認され、mlcA及びmlcCについても該細胞内で転写されていることが示唆された。

【0142】

各シグナルの位置は、転写産物の相対的なサイズを示すものではない。

### 3) 5' RACEによる5' -末端配列の決定

各構造遺伝子の5' -末端領域を含むcDNAの取得は、5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA

ends, Version 2.0 (GIBCO社製) を用いて行なった。

【0143】

実施例7及び本実施例の2)の結果より推定されたpML48の挿入配列上の各構造遺伝子において、コード領域であり且つ該遺伝子の5' -末端近傍に位置すると考えられる塩基配列に基いて設計されたアンチセンス側のオリゴヌクレオチドDNAを2種類作製した。

【0144】

表2に、各構造遺伝子の、より3' -側に位置する塩基配列に基いて設計されたアンチセンス側のオリゴヌクレオチドDNA(1)の塩基配列を、表3に、より5' -側に位置する塩基配列に基いて設計されたアンチセンス側のオリゴヌクレオチドDNA(2)の塩基配列を、それぞれ記載した。

【0145】

【表2】

5' RACEによる5' -末端配列解析に用いるオリゴヌクレオチドDNA(1)

遺伝子	配列表の配列番号：塩基配列
mlcA	配列番号 5 : gcatgttcaatttgctctc
mlcB	配列番号 6 : ctggatcagacttttctgc
mlcC	配列番号 7 : gtcgcagtagcatgggcc
mlcD	配列番号 8 : gtcagagtgatgctcttctc
mlcE	配列番号 9 : gttgagaggattgtgagggc
mlcR	配列番号 10 : ttgcttggttgattgtc

【0146】

【表3】

5' RACEによる5' -末端配列解析に用いるオリゴヌクレオチドDNA (2)

遺伝子	配列表の配列番号：塩基配列
mlcA	配列番号11: catggtactctcgcccgttc
mlcB	配列番号12: ctccccagtaagtaagctc
mlcC	配列番号13: ccataatgagtgtgactgttc
mlcD	配列番号14: gaacatctgcacccccgtc
mlcE	配列番号15: ggaaggcaaagaaagtgtac
mlcR	配列番号16: agattcattgctgttgcatc

オリゴヌクレオチドDNA (1) をプライマーとし、ペニシリウム・シトリナム SANK13380株の全RNAを鋳型とした逆転写反応によりcDNA第一鎖を合成した。すなわち、1  $\mu$ gの全RNA、2.5 pmolのオリゴヌクレオチドDNA (1)、1  $\mu$ lのSUPER SCRIPT™ II reverse transcriptase (このキットに含まれる。)を含む24  $\mu$ lの反応液を、16℃にて1時間保温した後、生成物をこのキットに含まれるGLASSMAXスピントリッジに添加してcDNA第一鎖を精製した。

## 【0147】

cDNA第一鎖の3' -末端に、このキットに含まれるterminal deoxyribonucleotidyl transferaseによりポリC鎖を付加させた。

## 【0148】

3' -末端にポリC鎖の付加したcDNA第一鎖、40 pmolのオリゴヌクレオチドDNA (2) 及び40 pmolのAbridged Anchor Primer (このキットに含まれる) を含む50  $\mu$ lの反応液を、94℃にて2分間保温し、続いて、94℃にて30秒、55℃にて30秒、及び、72℃にて2分間を1サイクルとする反応を35回行なった後、72℃にて5分間、4℃にて

18時間保温した。得られた産物をアガロースゲル電気泳動に供した後、ゲルからDNAを回収し、フェノール・クロロホルム抽出及びエタノール沈澱により産物を精製し、実施例4記載の方法に準じてpCR2.1を用いてクローニングした。

【0149】

以上の操作を5' RACEという。

【0150】

5' -末端を含むcDNA断片の塩基配列を決定し、転写開始点及び翻訳開始コドンの位置を推定した。

【0151】

5' RACEにより得られた各構造遺伝子に対応する5' -末端cDNA断片の塩基配列を記載した配列表の配列番号を表4に表示した。また、表5に、各構造遺伝子の転写開始点及び翻訳開始の存在する配列番号、転写開始点の位置及び翻訳開始点の位置を記載した。

【0152】

【表4】

各5' -末端cDNA断片の塩基配列を示した配列表の配列番号

遺伝子	配列表の配列番号
mlcA	配列番号17
mlcB	配列番号18
mlcC	配列番号19
mlcD	配列番号20
mlcE	配列番号21
mlcR	配列番号22

【0153】



【表 5】

各遺伝子の転写開始点及び翻訳開始コドンの位置

遺伝子 番号	翻訳開始コドンの 存在する配列番号*	配列番号 1 又は 2 におけるヌクレオチド	
		転写開始点	翻訳開始コドン
mlcA	配列番号 2	2 2 9 1 3	2 3 0 4 5 ~ 2 3 0 4 7
mlcB	配列番号 2	1 1 6 8 9	1 1 7 4 8 ~ 1 1 7 5 0
mlcC	配列番号 1	1 1 6 4 1	1 1 7 9 6 ~ 1 1 7 9 8
mlcD	配列番号 1	2 4 0 6 6	2 4 3 2 1 ~ 2 4 3 2 3
mlcE	配列番号 2	3 3 9 9	3 5 4 5 ~ 3 5 4 7
mlcR	配列番号 2	3 6 5	4 0 0 ~ 4 0 2

\* 配列表の配列番号 1 及び 2 に示される塩基配列は、互いに、完全に相補的である。

#### 4) 3' RACEによる3' -末端配列の決定

各構造遺伝子の3' -末端領域を含むcDNAの取得は、Ready To Go: T-Primed First-Strand kit (ファルマシア社製) を用いて行なった。

#### 【0154】

実施例 7 及び本実施例の 2) の結果より推定された pML 48 の挿入塩基配列上の各構造遺伝子において、コード領域であり、構造遺伝子の 3' -末端近傍に位置すると考えられるセンス側のオリゴヌクレオチド DNA (3) を 1 種類ずつを作製した。

#### 【0155】

表 6 に各構造遺伝子について作製したオリゴヌクレオチド DNA (3) の塩基配列を表示した。

#### 【0156】

【表6】

3' RACEによる3' -末端配列解析に用いるオリゴヌクレオチドDNA (3)

遺伝子	配列表の配列番号：塩基配列
mlcA	配列番号23：atcataccatcttcaacaac
mlcB	配列番号24：gctagaataggttacaagcc
mlcC	配列番号25：acattgccaggcaccocagac
mlcD	配列番号26：caacgcccaagctgccaatc
mlcE	配列番号27：gtcttttctactatctacc
mlcR	配列番号28：ctttcccagctgctactatc

オリゴヌクレオチドDNA (3) をプライマーとし、ペニシリウム・シトリナム SANK13380株の全RNA (1  $\mu$ g) を鋳型とした逆転写反応によりcDNA第一鎖を合成した。

## 【0157】

cDNA第一鎖、40 pmolのオリゴヌクレオチドDNA (3) 及びNot I - d (T) 18プライマー (このキットに含まれる。) を含む100  $\mu$ lの反応液を、94℃にて2分間保温し、続いて、94℃にて30秒、55℃にて30秒、及び、72℃にて2分間を1サイクルとする反応を35回行なった後、72℃にて5分間、4℃にて18時間保温した。得られた産物をアガロースゲル電気泳動に供した後、ゲルからDNAを回収し、フェノール・クロロホルム抽出及びエタノール沈澱により産物を精製し、実施例4記載の方法に準じてPCR2.1を用いてクローニングした。

## 【0158】

以上の操作を3' RACEという。

## 【0159】

得られたcDNAの3' -側断片の塩基配列を決定し、翻訳終止コドンの位置を推定した。

## 【0160】

3' RACEにより得られた各構造遺伝子に対応する3'-末端cDNA断片の塩基配列を記載した配列表の配列番号を表7にまとめた。また、表8に、各構造遺伝子の翻訳終止コドン及び該コドンの位置を配列表の配列番号1又は2に基づいて記載した。

【0161】

【表7】

各3'-末端cDNA断片の塩基配列を示した配列表の配列番号

遺伝子	配列表の配列番号
mlcA	配列番号29
mlcB	配列番号30
mlcC	配列番号31
mlcD	配列番号32
mlcE	配列番号33
mlcR	配列番号34

【0162】

【表8】

各構造遺伝子の翻訳終止コドン及び該翻訳終止コドンの位置

遺伝子	翻訳終止 コドン	翻訳終止コドンの 存在する配列番号*	配列番号1又は2における 翻訳終止コドンのヌクレオ チド番号
mlcA	tag	配列番号2	32723～32725
mlcB	taa	配列番号2	19840～19842
mlcC	taa	配列番号1	13479～13481
mlcD	tga	配列番号1	27890～27892
mlcE	tga	配列番号2	5730～5732
mlcR	tag	配列番号2	1915～1917

\* 配列表の配列番号1及び2に示される塩基配列は、互いに、完全に相補的である。

さらに、各構造遺伝子がコードすると推定されるポリペプチドのC末端のアミノ酸残基、そのアミノ酸残基をコードするトリヌクレオチドの塩基配列及びそのトリヌクレオチドの位置を表9に記載した。

【0163】

【表 9】

各構造遺伝子のコードするポリペプチドの C 末端アミノ酸

遺 伝 子	C 末端 アミノ 酸残基	該アミノ酸をコー ドするトリヌクレ オチドの塩基配列	該トリヌクレ オチドの存在 する配列番号 *	配列番号 1 又は 2 にお ける該トリヌクレオチ ドのヌクレオチド番号
mlcA	アラニン	gcc	配列番号 2	3 2 7 2 0 ~ 3 2 7 2 2
mlcB	セリン	agt	配列番号 2	1 9 8 3 7 ~ 1 9 8 3 9
mlcC	システイン	tgc	配列番号 1	1 3 4 7 6 ~ 1 3 4 7 8
mlcD	アルギニン	cgc	配列番号 1	2 7 8 8 7 ~ 2 7 8 8 9
mlcE	アラニン	gct	配列番号 2	5 7 2 7 ~ 5 7 2 9
mlcR	アラニン	gct	配列番号 2	1 9 1 2 ~ 1 9 1 4

\* 配列表の配列番号 1 及び 2 に示される塩基配列は、互いに、完全に相補的である。

さらに、表 8 記載の翻訳終止コドンに対する相補配列、該相補配列の存在する配列番号、及び、該相補配列の位置を表 10 にまとめた。

【0164】

【表 10】

各構造遺伝子の翻訳終始コドンに対する相補配列

遺 伝 子	翻 訳 終 始 コ ド ン	該相補配列の存在 に対する相補配 列	する配列番号 *	配列番号 1 又は 2 にお ける該相補配列のヌクレオ チド番号
mlcA	cta		配列番号 1	1 4 7 9 ~ 1 4 8 1
mlcB	tta		配列番号 1	1 4 3 6 2 ~ 1 4 3 6 4
mlcC	tta		配列番号 2	2 0 7 2 3 ~ 2 0 7 2 5
mlcD	tca		配列番号 2	6 3 1 2 ~ 6 3 1 4
mlcE	tca		配列番号 1	2 8 4 7 2 ~ 2 8 4 7 4
mlcR	cta		配列番号 1	3 2 2 8 7 ~ 3 2 2 8 9

\* 配列表の配列番号 1 及び 2 に示される塩基配列は、互いに、完全に相補的である。

以上の通り、各構造遺伝子の存在、その方向及びその位置が明らかとなった。これらの情報に基いて、各構造遺伝子の転写産物及び翻訳産物を取得することが可能である。

実施例 9. 構造遺伝子 m l c R に対応する M L - 2 3 6 B 生合成促進 c D N A の取得

### 1) 全 R N A の調製

ペニシリウム・シトリナムの全 R N A は実施例 8 の方法に従って調製した。

### 2) プライマーの設計

実施例 8 により決定された構造遺伝子 m l c R に対応する完全長の c D N A を取得するために、m l c R の 5' - 上流域のヌクレオチド配列よりセンス・プライマー (5' - ggatccatgtccctgccgcgatgcaacgattc-3' : 配列表の配列番号 3 5 番参照) を、3' - 下流域のヌクレオチド配列よりアンチセンス・プライマー (5' - gatccctaagcaatattgtgtttcttcgc-3' : 配列表の配列番号 3 6 番参照) を、それぞれ設計及び合成した。該合成はホスフォロアミダイト法により行った。

### 3) R T - P C R

m l c R の遺伝子産物をコードする完全長の c D N A を取得するために、T a k a r a R N A L A P C R k i t (A M V) V e r . 1 . 1 を用いた。

#### 【 0 1 6 5 】

1  $\mu$  g の全 R N A、キットに添付の R a n d o m 9 m e r s プライマーを 2 . 5 p m o l、1  $\mu$  l の逆転写酵素 (キットに含まれる。) を含む 2 0  $\mu$  l の反応液を 4 2  $^{\circ}$  C にて 3 0 分保温し、c D N A 第 1 鎖を合成した後、9 9  $^{\circ}$  C にて 5 分間加熱して逆転写酵素を失活させた。

#### 【 0 1 6 6 】

c D N A 第 1 鎖反応溶液全量、4 0 p m o l のセンス・プライマー及び 4 0 p m o l のアンチセンス・プライマーを含む総容 1 0 0  $\mu$  l の反応液を、9 4  $^{\circ}$  C にて 2 分間保温し、続いて、9 4  $^{\circ}$  C にて 3 0 秒、6 0  $^{\circ}$  C にて 3 0 秒、及び、7 2  $^{\circ}$  C にて 2 分間を 1 サイクルとする反応を 3 0 回行なった後、7 2  $^{\circ}$  C にて 5 分間、4  $^{\circ}$  C にて 1 8 時間保温した。得られた産物をアガロースゲル電気泳動に供した後、

ゲルからDNAを回収し、フェノール・クロロホルム抽出及びエタノール沈澱により産物を精製した。つづいて、実施例4記載の方法に準じてpCR2.1を用いて、大腸菌のコンピテント・セルJM109株（宝酒造（株）製）を形質転換し、形質転換大腸菌から該DNA断片を所有したプラスミドを保持する株を選抜し、この株が保有するプラスミドをpCRexpRと命名した。

【0167】

得られた組換えDNAベクターpCRexpR中の挿入DNAの塩基配列を決定したところ、該挿入DNAは構造遺伝子m1cRに対応する完全長のcDNAを含んでいた。以下、該挿入DNAを単に「cDNA」と言い、その塩基配列及びその塩基配列から推定されるペプチドのアミノ酸配列は、配列表の配列番号37に記載されている。

#### 実施例10. 発現ベクターpSAK700の構築

実施例1記載のベクターpSAK333及びpSAK360を用いて、cDNA発現ベクターpSAK700の構築を行なった。

1) pSAK333を制限酵素BamH1とHind3（宝酒造（株）製）で二重消化し、アガロースゲル電気泳動後、4.1kb断片をゲルより回収し、T4DNAポリメラーゼ（宝酒造（株）製）で該DNA断片の末端を平滑化した。

2) DNA ligation kit Ver. 2（宝酒造（株）製）を用いて上記DNA断片に、EcoRI-NotI-BamH1アダプター（宝酒造（株）製）を連結し、大腸菌のコンピテント・セルJM109株（宝酒造（株）製）を形質転換した。形質転換大腸菌からアダプターを所有したプラスミドを保有する株を選抜し、この株が保有するプラスミドをpSAK410と命名した。

3) pSAK360を制限酵素Pvu2及びSsp1で二重消化した後、電気泳動を行ない、アスペルギルス・ニデュランス由来の3-ホスホグリセレートキナーゼ（3-phosphoglycerate kinase: 以下、「pgk」という。）遺伝子のプロモーター及びターミネーター、大腸菌由来のHPTを含有するDNA断片（約2.9kb）をゲルより回収した。

4) 回収した上記DNA断片を、pSAK410のPvu2部位に、DNA 1

igation kit Ver. 2 (宝酒造 (株) 製) を用いて連結し、大腸菌のコンピテント・セルJM109株 (宝酒造 (株) 製) を形質転換した。形質転換大腸菌から該DNA断片を所有したプラスミドを保持する株を選抜し、この株が保有するプラスミドをpSAK700と命名した。

【0168】

pSAK700の構築手順を図4に記載する。

【0169】

pSAK700は、アダプター由来のBamHI及びNotIの各制限酵素認識部位を1つずつ有する。また、pSAK700は選択マーカーとして、アンピシリン耐性遺伝子 (Ampicillin resistant gene: 以下、「Amp<sup>r</sup>」という。) 及びハイグロマイシン耐性遺伝子であるHTPを有している。以下の実施例において、大腸菌を宿主とする場合、pSAK700又は外来DNAを挿入したpSAK700による形質転換体の選択は、40 $\mu$ g/mlのアンピシリンを培地に添加して行なった。ペニシリウム・シトリナム SANK13380を宿主とする場合、pSAK700又は外来DNAを挿入したpSAK700による形質転換体の選択は、200 $\mu$ g/mlのハイグロマイシンBを培地に添加して行なった。

【0170】

実施例11. cDNA発現ベクターpSAKexpRの構築

1) 実施例9で得られた組換えDNAベクターpCReXPを制限酵素BamHI (宝酒造 (株) 製) の存在下で37℃にて2時間反応させ、該反応物をアガロースゲル電気泳動に供し、mlcRの完全長cDNAを含む1.4kb付近のバンドをゲルより回収した。

2) pSAK700を制限酵素BamHI (宝酒造 (株) 製) で37℃1時間反応させた後、アルカリフォスファターゼ (宝酒造 (株) 製) を添加して65℃にて30分間反応させた。このようにBamHI消化されたpSAK700と、1) により得られた1.4kbのDNA断片を、DNA ligation kit Ver. 2 (宝酒造 (株) 製) を用いて連結し、大腸菌のコンピテント・



セルJM109株（宝酒造（株）製）を形質転換した。その結果、cDNA発現ベクターで形質転換された大腸菌株が得られた。

【0171】

本実施例で得られた形質転換大腸菌 *E. coli* pSAKexpR SANK 72599は、平成12年（2000年）1月25日付けで通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東町1丁目1番3号）に国際寄託され、受託番号FERM BP-7006を付与された。

実施例12. ML-236B生産菌の形質転換

1) プロトプラストの調製

ペニシリウム・シトリナム SANK13380株を培養したスラントより、白金耳を用いてPGA寒天培地に接種し、26℃にて14日間保温した。該培養物よりペニシリウム・シトリナム SANK13380株の胞子を回収し、 $1 \times 10^8$ 個の胞子を80mlのYPL-20培地に接種し、26℃にて1日間保温した。胞子の発芽を顕微鏡観察により確認した後、発芽胞子を、室温、5000×Gの条件下で10分間遠心分離して胞子を沈澱として回収した。胞子を滅菌水で3回洗浄した後、プロトプラスト化を行なった。すなわち、200mgのザイモリアーゼ20T（生化学工業（株）製）及び100mgのキチナーゼ（Sigma社製）を10mlの0.55M 塩化マグネシウムに溶解し、室温、5000×Gの条件下で10分間遠心分離して得られた上清を酵素液とし、20mlの酵素液及び湿重量0.5gの発芽胞子を100ml容三角フラスコに入れ、30℃にて60分間穏やかに振盪し、発芽胞子がプロトプラスト化したことを顕微鏡観察により確認した後、反応液を3G-2ガラスフィルター（HARIO社製）で濾過した。該濾液を、室温、1000×Gの条件下で10分間遠心分離し、プロトプラストを沈澱として回収した。

2) 形質転換

1) で得られたプロトプラストを30mlの0.55M 塩化マグネシウム溶液で2回、30mlの0.55M 塩化マグネシウム-50mM 塩化カルシウム-10mM 3-モルフォリノプロパンスルホン酸（pH6.3：以下、「M

CM溶液」という。)で1回それぞれ洗浄し、 $100\mu\text{l}$ の4%(w/v)ポリエチレングリコール8000-10mM 3-モルフォリノプロパンスルホン酸-0.0025%(w/v)ヘパリン(Sigma社製)-50mM 塩化マグネシウム(pH6.3:以下、「形質転換用溶液」という。)に懸濁した。約 $5\times 10^7$ 個のプロトプラストを含む $96\mu\text{l}$ の形質転換溶液及び $120\mu\text{g}$ のpSAKexpRを含む $10\mu\text{l}$ のTEを混合し、氷上で30分間静置した。これに1.2mlの20%(w/v)ポリエチレングリコール-50mM 塩化マグネシウム-10mM 3-モルフォリノプロパンスルホン酸(pH6.3)を加えて穏やかにピペティングし、室温、20分間静置した。これに10mlのMCM溶液を加えて穏やかに混合し、室温、 $1000\times G$ の条件下で10分間遠心分離した。沈澱より形質転換プロトプラストを回収した。

### 3) 形質転換プロトプラストにおける細胞壁の再生

2)で得られた形質転換プロトプラストを5mlの液状のVGS中層寒天培地に懸濁し、固化した10mlのVGS下層寒天培地プレートに重層した。該プレートを、 $26^{\circ}\text{C}$ にて1日間培養した後、プレート1枚につき5mgのハイグロマイシンB(Hygromycin B:Sigma社製)を含む10mlの液状のVGS上層寒天培地を重層した(ハイグロマイシンBの終濃度は $200\mu\text{g}/\text{ml}$ )。 $26^{\circ}\text{C}$ にて14日間保温して得られた菌株を、 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ のハイグロマイシンBを含有するPGA寒天培地上で継代培養した後、PGA寒天培地で作製したスラントに植え継ぎ、 $26^{\circ}\text{C}$ にて14日間保温した。

【0172】

該スラントは $4^{\circ}\text{C}$ で保存した。

### 試験例1. 形質転換株及び親株の有するML-236B生合成能の比較

実施例12において得られた形質転換株及び親株ペニシリウム・シトリナム SANK13380株を培養し、該培養物中のML-236B量を測定した。

【0173】

形質転換株を培養した実施例12記載のスラント又はペニシリウム・シトリナム SANK13380株を培養した実施例2記載のスラントより、5mm角の

菌体を、10 ml の MBG 3 - 8 培地を入れた 100 ml 容の三角フラスコに接種し、26℃にて2日間、振盪培養した後、3.5 ml の 50% (w/v) グリセリン溶液を添加し、さらに26℃にて10日間、振盪培養した。

【0174】

該培養物 10 ml に 50 ml の 0.2 規定水酸化ナトリウムを加え、26℃にて1時間、振盪しつつ保温した後、室温、3000×Gの条件下で2分間遠心分離し、1 ml の上清を回収し、9 ml の 50% メタノールと混合して HPLC に供した。

【0175】

HPLC のカラムには、SSC-ODS-262 (直径 6 mm、長さ 100 mm: センシュー科学 (株) 製) を用い、移動相には 75% (v/v) メタノール - 0.1% (v/v) トリエチルアミン - 0.1% (v/v) 酢酸を用い、室温にて 2 ml / 分の流速で溶出した。これら条件下において、ML-236B はカラム添加後 4.0 分に溶出された。検出は UV 検出器の吸収波長を 236 nm に設定して行なった。

【0176】

形質転換株のうち、ML-236B 生合成能の上昇した株 5 つが得られた。これらの ML-236B 生合成能は親株より平均 15% 高かった。これら 5 株の ML-236B 生合成能は、モノスポア処理等の継代を行なった後も安定に維持された。

【0177】

【発明の効果】

本発明において ML-236B 生産菌より得られた ML-236B 生合成促進 cDNA は、ML-236B 菌体内に導入されることにより該生産菌の ML-236B 生合成を促進する。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 大腸菌及び糸状菌に導入させることができ且つ長い DNA を挿入することができる DNA ベクター pSAKcos1 の構築図。

【図 2】 pML48 挿入配列の構造遺伝子解析。

【図 3】 pML 4 8 挿入配列のノーザンブロット・ハイブリダイゼーション。

【図 4】 大腸菌及び糸状菌に導入させることができる cDNA 発現ベクター p  
SAK 7 0 0 の構築図。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Sankyo Company, Limited

<120> The cDNA (R) which enhances the biosynthesis of ML-236B in ML-236B  
-producing organisms.

<130> 2000045SW

<140>

<141>

<160> 38

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 34203

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 1

gatcaatact acgtcgttgt tatttccttg tcagtaatga ctaacaaatt cccagaaca 60  
gacgaagtca cagctcacac cacaagagaa aatgagtcca gcgaggatta cagatttctc 120  
gccaggcaaa ccgagaaaag ctctcttatg catccacggt gccgggtgct cagcagccat 180  
attccgcgtc cagatctcta aactgcgcgt ggcggtgaaa aacgagtttg aattcgtata 240  
tgcgaccgcg ccgttttagt ccagccccgg acccggcgtg ctctctgtct tccaaggcat 300

ggggccatac tacacctggt tccaaaagca tcatgacgcc gttacaaaca cgacaacccc 360  
 cacggtgggc gatagagtag cggctgtgat cgggcctgtg caaaagaccg tccaagattg 420  
 gtctataact aaccacagc caccattgt cggcatagt gcttctctg agggcgctt 480  
 ggtcgccact ttgctgtcc atcaacagca aatgggaaaa ctgccatggt ttccgaaaat 540  
 gagcattgct gttttgattt gctgtttcta tagcgatgaa gccagagatt acatgagagc 600  
 cgaggcgcaa gacgacgacg acaagctaata atcaacgtg ccgacactgc atcttcacgg 660  
 tcgtcaagat tttgctctcc aagggtcgag acagatgggt gaaacacatt acctgcctca 720  
 gaatgcagat gtactcgagt ttccaggaaa gcataatttt cccaacagac cgagtgatgt 780  
 ccaggagacg gtcaagcgt tccaacagct atatcaaaag gtcaagatgt caggttcatt 840  
 tgtctagggt agacaacagg gtatatagca aggctctggc tctcatgcct agtccatacc 900  
 acatttttac tgaacaaatt tgaatagttc taatcttaca cggtttgaat gtcaccttc 960  
 caagggtgat ttagttatag tggtcgagc catctcataa atatttcgtg aacatatttt 1020  
 ggatagatca tggaaggctc gttctgaaca ggcatgacag acatctaaaa cactcgatc 1080  
 accacaacaa ggcactaaac cagtaactat ggaactattt gcaatggcgt cgaatttata 1140  
 tacaggatgg attgaaatca attccaagcc ttggagggtt caccttcctc acagagtctt 1200  
 tcgaaacgcg ctaccgaggt atatttatca ccgttacggt actctgaacc gcgctatcta 1260  
 acttgatggt acgattgctg caataaagaa gagcaacgaa ggtagaagta atttgacaa 1320  
 agatacaaga cgaattcgct atttgtagat gaatatgct gtgtcaattg acgccgaatt 1380  
 caggatagat ttgccatctg ctctattgcc aatttctaata ccatctttat catgaacaac 1440  
 actcaaacca cacatctgaa ttacggcgcc tgaacgatct aggccaactt cagagccggg 1500  
 ttcatcgaga acatagtgag gattgaagaa aagtggctta caaaggcctg agcgtgctca 1560  
 gggccataca gcgagctctg aagtttgaca tgaatgagtg ggtccttggt agggctatcc 1620  
 cacatctcga gaacgatgtc ataaggagtg cgctcacggg aagcgagAAC actcgtcatt 1680  
 ttggcattgc caattgagcc actctccgct tgaccctgct tgtaatcaaa gacagcctgg 1740  
 aacaaggggg cgtgtgtctg agtcttggtt tcctgcctg aggtaggagg attcaggcct 1800  
 agacagtcga ggatgacgcc atacggcacc cgcgcgtgtt gcatggcctc acgcacactg 1860  
 tccttggtgg ctacaagggt ctcgccgaat gtcttgctgc cgacgaactc atcaaagcgc 1920  
 aggggaagca cgttagcgaa aaagcccatc gccgaaattt ctccatggt ggatcggttg 1980  
 gtttcggcga ggccgatggt tatgtctttg ctgccggtaa gacgcgcca caaacgtgg 2040

taggcggcca ggtagaactg catgggggtt gccttgtgct tgcggctccg ctctttgatt 2100  
 cggaaggcga ccatgggata taaacgagca attgcttcat actgctgcca cgtgaatggc 2160  
 tgtatttgct gctgctctga attggcagca gggctcattga tcagattcat gatgggaagc 2220  
 acggttggcg cagatgacga gactttgcta tgcattggact tccagaacgc gatatcgctc 2280  
 cccattcgcc cattttccag gttttcccg cgttggacgg ctagatcaga gaattgggtc 2340  
 gatggctgct gcattttcac cccgctgtaa atctgcccga tctcattgaa caggttttct 2400  
 gttgttgagc catcaccaac taatctgtgg tagccgatta ccaacagggtg gtcattctgtg 2460  
 ccccagtaga aatcaacgag tctgagagtg tcacctgtgg agatgctata gtttgtcttc 2520  
 tcgagtttcc ggtactcttc ctctgcctcc gcagcgttgt tcacctgaac aaagtgcact 2580  
 ctgttctccg ggttcttgag aaccacttgg acgggacct ttaaactcgt gctatagtca 2640  
 tcgccagtaa caaagcacgt acggaagatc tcgtgacggc gcaatgaggc tttcagagcc 2700  
 cgcctcaacc ggtcgaggtc aatgggtacc ttcattgaaca tgccaatagt gttgttgaag 2760  
 atggtatgat cttttacat ttgttgctgc ctccaggaat actcctggcc aagggacaac 2820  
 ctctcgcgac gaagaatctt acggcctccc tgctcattat cgtcctcttg ctcttcatcc 2880  
 tcttcggctg acgacgcatc tgtgctggta gcagagcttg cttcatcatg gctgtctgtt 2940  
 ggtgtcggag aagccccgt gtccgagggt cccgtggaat caccaatttg caacagcagc 3000  
 ggaatggatg tagctgggag tcgggtggcc gcgtcgtcgg caagatcagc gacagaagca 3060  
 ccgccaagta cctcaagag tgggagggtca aggtagagtt gctttgagaa ccatgagccg 3120  
 acagtcactg cacccaagga gtcgacacct tgatcaatga gaggaatggt tgggtccacg 3180  
 ctctccccgt ccgaaacttg gagggtaaca cggagtttct cagatagacc atctgcaact 3240  
 ttgttagttt gaactcgata tcaggaaacg catgagagat aacttaccaa tcacgatttg 3300  
 ccgaacttgg tctaaagtgt ttgcttgttt gagctggctg gcaatggagc ctttagaccc 3360  
 tgatccattg tcgccaccgt ctccgcgttg accgggaatt ttgaagtctc cgaaacgagg 3420  
 gtcgttgaag taaataattc gatcttgaag cgcagggtca agatctggga taccctgggt 3480  
 aagctcaagg tccgccatgt caatgaccgt cttgcgtgtg ggttgctgcc gggcacgctg 3540  
 gtcagacacg accgcttcgg cgaaaagcgt gtgcagctca tgctcttcaa ctgagtcaaa 3600  
 catgaaacgg atagcatcaa agtcctctc catctcggcc ctctgacaa accctacacc 3660  
 gtaaacggca ccaatatcga tggttgatcc ctgtggttgt gcgttagtaa cttgacgtcg 3720  
 atgcatgata attcagggtt agaaaatacc gccaatctc tggcgcaccg ttgctgggcc 3780

agagcctgta gtaggcatt cgcagcgcca tagttggact ggccaggatt gccataaact 3840  
 gcaacaatgg acgaaaacat gatgaagaag tcgagcgctt tgctgcccgt ctgttcggag 3900  
 aaccgttcat gaagaatgcg tgctccttgt accttgggct tcaacacat gtccatcatc 3960  
 tgggtggtcca tgttcttcag catgacatcc tgcagcacca aaggcccgaa cgcgatgccg 4020  
 gcaacagggtg gcaacttcat atcgacaagc ttgccaaggc cagcatcgac tgaatcctca 4080  
 ttggcaacat ccctaaagaa agtaattgga taagtaaagc aggatgtggt agcaagggtg 4140  
 gatgtgatat caatcaactt acattgacag aacgggtgatg tcaccaccaa gtgcctccat 4200  
 gttggcgatc catttgggat caagtcgagg gttccggcta gtgagcacia catggcgggc 4260  
 gccatgcaag atcatccagc gacagagaga gcgaccaagg tccccggtaa gaccaacaag 4320  
 caaatacgtc ttcttgttgg aaaataagtt accagagtcg atggggcaaa tcctagcgga 4380  
 cacctcattt tccttccagt cgatgacggg ggccagattg aagcgttggt cattgtggtt 4440  
 gacagagagc tgaccaggca agagaatttg tgtggctgta ataactttct cagtgtcgtc 4500  
 gacagtcgac gcagagacgg ttttttttgc cattgccaca gagtgtctga ggattggaat 4560  
 atcctcaaca tgactaactt tgtatgtgga agctgtactt cggataagat agtcaccact 4620  
 gtacatgaag caactgggtg gtagcaactt ggccaaacgg ttggttatcc cggcagcagt 4680  
 ccggtcggta gacaagtcaa agaatgccat catgtttgtc ggcaggctgt gtttcagccg 4740  
 agcgtcgggtt tccttggcat gtaatcggat ccaaggagcc ggaatagttt tgacgtcga 4800  
 cagagttggt gccaaatgaa cctgaacacc gtaggttttg gccgactcca gaattgctt 4860  
 gacgcagaag attgggggct ccataatcag aattgatgca tcagagccaa aggactgagc 4920  
 gctagagaga attgtttcgg caaggagggc tgcagctgtg gacaacaaga aggaactatc 4980  
 ctgccttcc gccatgttat cgggcagact atgcatgtag tttctcggt catgcagtat 5040  
 agatccattc ttctcagcca gggcgactac aggcacctca catgtattct ccagaatact 5100  
 gccctgcag acatggaagt atccgagatg gccacgcga attgcctggg gaagagcgta 5160  
 gcgaacacga acagttgctt ttccagcatg acgagcgtct tctaacgaat cacacgtctc 5220  
 ggttgactca agatagtaca tcgatgagga tgctcccctc gcctctttca gtgcaatggc 5280  
 cgtcttggac gaattaaagt taccgaaaat tggacgacga gacgagttca tacggtcgtt 5340  
 cctagcaata tcctgcttca aacgagggac ccaggcacga cccttgcacc agtacacttc 5400  
 gggctcatga gtccatgtta ttgattccaa aagctgatca tcgtctcct cgaagcgcaa 5460  
 aagttgctca acgaagaatt tgggtgtctag gttctccaca gtatcgacat cgaagacgtg 5520



cggtcccaag tcagggttct cgagcttgat tgtcctcaac attccgatgg tgctggcctg 5580  
 gtggggatga tcaatccagg cattctctgt cagccacatc atgcgtccgg cgtagaagag 5640  
 aagagacttg actgcctcaa acttgctctc ttcaaggttg caaaacactt catcatcaag 5700  
 ttccgagagg atgacaaaag tcgacttagg ctgcaaggcc gggtcgtcga gaacactttc 5760  
 cagccgcttg acggagtgga tgtgtctatg cggtagggca gctttcatgt cgttcaaaat 5820  
 gcgttcggtt tttgtcgatt cgccaccgat aaccactaat ggccgggtatg agtccttcaa 5880  
 tggagcagaa agtggatcat acaaacgctc aacgggtggca tccacagcat gtgtactgaa 5940  
 gacagacggg atcaaactat cctctcgatc aagtgtccga ctatcgacgc cagagaaccc 6000  
 aactctcttg agggatatgt cccattggtc aacggacccc gaggcactca aagcacgagt 6060  
 ttctgtctct ccagtcctac gatcagcgaa aagcccagag atgaaggcga ggcgagcagg 6120  
 ctgcgcatgg gtgacccga aagtaaccaa gtgaccacc ggcttgagca aggaccttat 6180  
 gtgagccaat ttttctcga agttggagct ggcatggagg acatcggatg caataatcag 6240  
 atcgtaggag tgaggcttga atccttgctc tgctgggctt ctgttgatgt ctagtgcctc 6300  
 aaactgcatg agaccgtcga attcggaag ttgttcacgg gccttgccaa taacatccgc 6360  
 cgagatgtca gtgcaagtgt aactgttgaa accaagttga ggtgatgcaa gaacgcgctt 6420  
 cgtggcgatg cctgtaccca agcctaaaaa gcgaacgaca gattagcaaa ctgcctagtt 6480  
 acttacattt cagattcgac ttaccgatct caaggatata aatggattgg tagcgatgag 6540  
 caatttggct aaccagatcc tgaacgacgt gtattgctga gccaaaggcg agcttggttg 6600  
 tatagtactc ggtgaacaac ccacgcgggt tcatgatata caaaggatcc ccgttcccgc 6660  
 gaacaattga aattaattct ttgcctaccc tttggatcag gcgcacatgt ggggtgggacg 6720  
 agttgcttca agtaaaagg taatataaaa gaatgaaaa acacggaaca gctttgggtg 6780  
 tacctttcac acatttgctc aatgtgaaca gaagtgtcct cctcccaaga ctctgtgtac 6840  
 cactgatggg ggccagcccg agcatcggcc tgaacctggg cacaccattc aatgtacttc 6900  
 tgggaatgga ggtcggcatt ttgacggctg tcgggggtta tctgggctag gaaggatttg 6960  
 atgtagaagt aaacgattcg ctcgatggtc agaatgtcct ccttgtcccg agctatgatc 7020  
 aacgtcgcag ggtcctccag cagtttttcg ggctgtaggg gtccccagac ccactttgcg 7080  
 aagattcggt ggtcggctga agcagtcggg ggagagaaa gcttaaagac aatgttatca 7140  
 acttggaata gcgttgtctt ggtcgaatcg tacaccgtga tgcgcccgt caggaaatca 7200  
 cccttgctgt gtgtgttgat tgtgtcaaac gcaagctcgg tttcaccaga attaccgcc 7260

gatatacaga gcgatggaat cagagtcact ctgtcaacgt gagtaggcac gtacaatgag 7320  
cgtaggcgac gatctcctgg agaggaatac gtcceaatac cagtctggaa cgcgatgtcc 7380  
agggcgctg ggtggagcaa gaggggctca ttgcgaatt catccttaag tggaaggaaa 7440  
gccaaaggtgc cgctagcttt ggagtcggcc cttctcatgg tctgcaaacg acggaagtct 7500  
ttgctgtagt cataccaag gaggtcaagt tcccgataga agaaatcgat gttgacattg 7560  
ttcatctggg ggtactcttc ctcaggtggc ggcaaaagct gcgatgacgg tgatgcctcg 7620  
ccaagggtta tgacgatttg gcctttggcg gatgtcgaaa gtcactctc ctttgccaga 7680  
caggaatcaa taacaaattt gaccgtgact tggccatccg catcattgtc actggtgact 7740  
tcggctgtca agttcagctc cacggaggtg tttcatctt caaacacgat ggctttgttg 7800  
atgctcatgt ccaagatttc caggagctga acttgggagg cagctcacc agccaccttc 7860  
atggcagctt ccatggccat aattatgtac ccagcagcgg ggaacacagt ctggccttgt 7920  
agcgcgatgac cgtcgagcca ttccagatcc cggggcctga tgaagtttgt ccactggaag 7980  
gtcgatgctg tgctgtaaga agaaagcttt ccaagcagaa gatggggcgc acctccacga 8040  
agatgctggc gggtaggagc agattctgcc cagtattgac gagtatgac ccaagagtat 8100  
gtgggcaatg actttgacag gttttgaacg gcacgatcgg gccggacttg ttgtacgaag 8160  
ccctcggcgt cgatactccg aactccgaaa cgctccaaa tgtatcccag acctccagca 8220  
aaagcgtcca catcgtcaac gtttcgtgcc aagcaccgg tatacggcag ctccacaccg 8280  
gcaagagcat ccttgatggt ggctagacac ggacccttga gagcaggggtg ggcgccaatt 8340  
tcgatggcga cgtcgattag acgatgagtg atgactgctt tctgcacagc ctgcgagaac 8400  
aagaccggag agacgagatt gtctttccaa taagcgggca tcacatcctg tacagtcatt 8460  
tgcttgctgg tctcgtggac ggcagagaac caagcaacac tatcgttacc ttggccatcg 8520  
gcaacagcac agtcgcactc cagcaatgcc ttgacatatg gagctgcgca tgggtgcatg 8580  
tgatgcgaat ggtaggcctt gtcaactctc aagattctgg caaaagtgga ttcactctcc 8640  
aagacacctt caacgtgctg gatagcatcc atgtcgccgg agaaggtcac actatccggt 8700  
gaattgctag cggcgacgca gacccgaccc tcaaaggctt cgagctcgca tagttccttt 8760  
gcgtcatcgt acgacatacc tgccgctagc atagcgctg tctggccgct tggagaagag 8820  
gcatgctccg cggacacaac tccacgcaga tgcgcaatac ggatagcttg agtggcactg 8880  
atgaatcctg ccgcaaaggc acaggcaatc tcacctgaac tgtggccgac aattgcactg 8940  
aactcgatac cagctgcagc gagaagtcgg accagaacga tttgtacggc gcagcataga 9000

ggctgggaga agctggcgag tctgacgttt gaggcattccc cttcaagcat gagctgggtca 9060  
 tacagtgtcc acgtaggccg atacttttca ggcagtgttt gcagtgaatt atccagctct 9120  
 tcgagaatgc ctctcacaaa tggcataccc accatgagct tcttcagcat gcccggccac 9180  
 tgtgcacctt ggccagtaaa gacacctagt acgcgagggt tgtcattcgc gtcggtgcgg 9240  
 aagtcggtga cgacctcacc gtccgcgatg gcagcctcca gtgccgcgcg ggctacttcc 9300  
 ttgtttgtgtg ctgcaatcgc acgacggaag ggcaagatag accgtttctc aagtaaggta 9360  
 tatgcgatat catgcatgtc cacgicacat tgcgtttcca gaaattggag catattttct 9420  
 agcgttgcct tcatggagcg ctgcgacttc gatgaaagca caaggggcaa gctgcatgca 9480  
 tctgcatctg aggtcacctc tgttaccact gctgtcggct tgtgtggagg agccatatac 9540  
 tcttcgataa tagcatgggc atttgtacca ccaaactctg atgtgtttat atgttttagct 9600  
 aacttcactt tcgtttctca gaagtgcagt tgaatcctta ccaaataaat taacgctgac 9660  
 tctgcgaggc tgcccgggcg caacaatcgg ccattctgtg gcctccgttg caattttcaa 9720  
 gtgcgtatag aacggagcga cacggggact gatctttctc aacagcaggt ttggcgggat 9780  
 cacgccattt cgtacagcaa acgatgcctt cattaagccc gcaataccag cagtgccttc 9840  
 cgtgtgaccg agaactgtct tgatgtgcc gacaaaaagc tcatttttct cgccgtcgt 9900  
 gtcgattgtt ccatccttgt gtccgaagaa ggctgttgca atagcctcag cttcctgtgg 9960  
 gtcaccggct ggtgtaccag ttcctgggat cttcgtgtta gggagagaga gactttctgc 10020  
 aacttcata aggctgatac ttccaggga taccacttac catgggcttc aaagaactgg 10080  
 cagcgttcct gggggtttgt aatatcaaga ccagccttg catatgtggc ccgaatgagg 10140  
 gcttcttgtg cgctatggtt tggcattgtg atacctgtc ttcggccatc ttggttgata 10200  
 ccggtctctc ggataacaca ctcgatactg tccccgtcgc gcagtgcctg gtcagcgtt 10260  
 ttcaggacaa tagagcaaac accttcctaa aaagcagtta caggaggta gtgccatctt 10320  
 gctttttttg aaaggaattg atgcattgtc aacttactcc tctggcatat ccatcggcag 10380  
 cagcatccca cattcgagat ctaccattgg gggacagcat gttcaatttg ctctccatta 10440  
 caaaggatcat ggggcccatt atcagattcg caccggctgc aaccgccatg gtactctcgc 10500  
 ccgttctaag ctgttgacg gccagatgca cggcagctaa ggatgaacta caggctgtgt 10560  
 cgatcgtcat ctgcagaatc agtcaggaat ctgtcagcac ttgacgaagt cgggctcgt 10620  
 caatgagtgg cactcacact cggcccatgc cagtcgaaga agtatgatac acggttggag 10680  
 gccacactga cagctacccc cgtggcagag tatgtaggaa tactatccaa ttcacgcgtc 10740

acgatatgtct catagtcatg cgtcatcata cgcacgtaca cagcagtaga ggatccttga 10800  
 aggcccttga tccgtaggcc tgcgttggat acagcttcat agaccgtctc cagcagcagc 10860  
 ctttgctgtg ggtcaatcgt ttcggcctct ccagcttga tgttgaagaa agaggcatca 10920  
 aaaccgcgta gatcctcctg cagcaagtat gcaaagggtg cgttcgtgcg cccgggggtga 10980  
 gtgccatcgg ggctgtaaaa tgtatcgacg tcaaattctct ccttagggat cttggctctgt 11040  
 acatcccggg gctctttgag cagctcccaa agttttgatg gtgtgttgac accacctgga 11100  
 aaccgacaac cgcttccac taccacaatt ggctcgtttg gatagttggc ttgatccata 11160  
 actgctgac ctgtttttgg gcgataggat tgggattaaa cttgtcttg cgtcagtaga 11220  
 tcttctcact gcatgccggg cacaacattt gttcttacag aatcgagag ttgaattctct 11280  
 gagegaacaa gccggccttg caaccgatac cgtcgttata ttacttgca cgtatcagta 11340  
 ctcatctaga ttccggacaat ttcaagatcc attctagtag tcaaatgccc ccacttccca 11400  
 gcaatgcaag ctccggcacct agcaaaccct cccggcgta ttcgggtgcac gaatagccat 11460  
 tcctccatac ggcgttattc ggtcacacga ggctgaatga atcaaactg aatatcaatt 11520  
 ggctgtatca aggtgaaacc gagtttttca ctccgattgt tcttgctgctg ctccggtgaag 11580  
 ctgctcctaa aggaacaac cgaactgccc catccaggta aacttcgatt gggggggggg 11640  
 tttttttttt ttcaaggttg actggaagag tgctctcgcc caaaaatcc cagaagcatt 11700  
 agtgctgtta ttcgattata aaccgtcgca gcgtctcat tcttcgtctt tcttctttt 11760  
 ccactgggtg gcataggctc tatctgtctc acgcaatgct cggccagggt cttctgaccg 11820  
 tcgaatcgta ccaatgggta tcgacccctc aagcccttgt ggccggtcgca gtgcttctta 11880  
 gtctcctgc ctaccgtttg cgggggcgcc agtccgaact gcaagtctat aatcccaaaa 11940  
 aatgggtggga gttgacgacc atgagggtca ggcaggactt cgatacgtat ggcccgagct 12000  
 ggatcgaagc ttggttctcg aaaaacgaca agcccctgcg cttcattgtt gattccggct 12060  
 attgcacat cctcccatcg tccatggccg acgagtttgc gaaaatcaaa gatagtgtga 12120  
 tgtacaagtt ttggcggtat gtatgacctc tgaattttcc attgttgtaa ctcaatgacg 12180  
 tctctaagat tctgatgaat gtataggact ttcactctca tctccctgga ttcgacgggt 12240  
 tcaaggaaat ctgccaggat gcacatcttg tcaacaaagt tgttttgaac cagttacaaa 12300  
 cccaagcccc caagtacaca aagccattgg ctacctggc cgacgtact attgccaagt 12360  
 tgttcggtaa aagcgagggt aagtgtcaat ttttctgtct tgagcattga gcctctggct 12420  
 gacataccgc gaatatata gagtggcaaa ccgcacctgt ctattccaat ggattggacc 12480

ttgtcacacg aacagtcaca ctcatatgg tcggcgacaa aatctgccac aatgaggagt 12540  
ggctggatat tgcaaagaac catgccgtga gtgtggcggt acaagctcgc caacttcgcg 12600  
tatggcccat gctactgcga ccgtcgtc actggtttca accgcaagga cgcaaattgc 12660  
gtgaccaagt gcgccgcga cgaaagatca ttgatcctga gattcagcga cgacgtgctg 12720  
aaaaggccgc atgtgtagcg aagggcgtgc agccgcccc gtacgtcgat accatgcaat 12780  
ggtttgaaga caccgcccgc ggccgctggt acgatgtggc ggggtgctcag ctcgctatgg 12840  
atttcgccgg catctacgcc tcgacggatc ttttcgtcgg tgcccttggt gacattgcca 12900  
ggcaccacga ccttattcag cctctccgcc aagagatccg cactgtaatc ggagaagggg 12960  
gctggacgcc tgcctctctg ttcaagctga agctcctcga cagctgcatg aaagagacgc 13020  
agcgaatcaa gccggtcgag tgcgccacta tgcgcagtac cgctctcaga gacatcactc 13080  
tatccaatgg cctcttcatt cccaagggcg agttggccgc tgtggctgca gaccgcatga 13140  
acaaccctga tgtgtgggaa aacccccgaa attatgatcc ctaccgattt atgcgcatgc 13200  
gcgaggatcc agacaaggcc ttcaccgctc aattggagaa taccaacggt gatcacatcg 13260  
gcttcggctg gaaccacgc gcttgtcccg ggccggttctt cgcctcgaag gaaatcaaga 13320  
ttctcctcgc tcatatactg attcagtatg atgtgaagcc tgtaccagga gacgatgaca 13380  
aatactaccg tcacgctttt agcgttcgta tgcattcaac cacaagctc atggtacgcc 13440  
ggcgcaacga ggacatccc ctcctcatg accggtgcta agatataaca cgcaaactaa 13500  
aacaatatg catccgtccc caggcttatt ccaatagttt ccgtcccaga gaaactaggt 13560  
gctgtattag tcgagtaggt tagtaaaata aaacgcattt tttcgattg tgatgccttc 13620  
tttgtaatcg aacgtggtgt agactttggc tatgtgcgag agacagaaac acagagagag 13680  
agaagggaga gagtgtgtat tctgtctacg cagagcggcc atctgcttct ataccgccag 13740  
ctacaccgcc acgtagggaa gtcggcagta atgaagcttt tctcccggtc caatcaccga 13800  
tctccccatt ctctcaggcg ttgactggcg cttacgatga cgagggtta ggctctgtta 13860  
agtcttgatg ttcctactca acatccccga ctaggcgaaa gagaggacgg cgcaacgacg 13920  
tggaacaaag tactccctcc cgccttcgga ctacatatcc acaatctgta ccactgccc 13980  
gtgccaacgc ctttcgaccg ttcaacgcgc atttacaagg cttgcgggaa tcataatgga 14040  
gagaaaaaga gagaactttt gacagtcaag cctccgaggt gctaagacag cttccctggt 14100  
agtataaaaa gcattcactc ttccgacttc gagaacgagt gcacatgtgt actttgttgc 14160  
ttctcagggc cactgtaatg gtatttcagg tatctctatt tactgctatc cagaagtcag 14220

gcattaaata gtcaggctca gccagggctc gattcagatt ggattcaggc ttcagacat 14280  
 ggccgctatg ctcttcgta ctatacctcc gtcgagctat acccgcttgg ccagacaaaa 14340  
 ggcttcactg aacccttcaa cttaactgca tttcgccaca actaactcga cgaggccggc 14400  
 gatgggtgta ccattcatga gctcaaagat cgacacatca acatggattt cagatgtgat 14460  
 ccagtttcga agttcaatgg cgacgagtga gtctacgccg acacctgcca ggtttttgga 14520  
 cgaggacatg tcgtcttctg ccagacaaaa cattcgcatc agcttttccg tcattgcttt 14580  
 gaggacgata gaaatggcct cgtcgtgaga ggtgaccctg cttagtggg cccgcacgcc 14640  
 atctggctct tttttatgcg aagagacaaa ggattggctc gcatgaagga cttggcggta 14700  
 ttttaagtccc acaaaccgct gttcctgtat ccagtttgcc tcgggtccagt gagcaccgg 14760  
 ggatgtgttg attcctgtaa ccacagctgc gggaggtgat ggaaattgag gggaagaaca 14820  
 caggattgcc ttctccaaca catccatgac gtccttttca tgcataggct tgtaacctat 14880  
 tctagcgagc cggtcggcca caccacggcc agtttcagcc acgtatccaa cagacttgac 14940  
 catgcccag tcaatggtga cagccggcat gccatgggct ctccgggtgt gcgcaagtgc 15000  
 gtcctggaat gcaccagcag ctgcgtaatt ggcctggcct gccccacca tgaccccaac 15060  
 aagggatgag agcatcacga agaagtcaac atcctgtgcg atcttgtgaa gataccaact 15120  
 accctgtact tttggcgctg ttgctgcatt aaattcatcc aatgtcattc gcgatagaag 15180  
 cgcgtccttg agaaccatgg caccttgtat gatacctcga attggcgggtg catgtgcttc 15240  
 ttgcacaaac cggagcacct tggtagacct atcttgatct gagatgtcac atgcgtgtag 15300  
 atagacagcg cactgttgat tttgcaagct ggttatgaat ggactggcct ttgcacttct 15360  
 cgataggata atcaagtgtc tcgcgccatg atcaacaagc cactgacaga tctgctttcc 15420  
 aattcccccc agcccaccag caactaggta agaactgtca ggcttcagct tcagcgagaa 15480  
 ccttccatcg ccgactggga ccagttcgtc cccagatata ttgaccacaa ctttgccaac 15540  
 atgctgacca ctctgcatc tacggaaggc cttctcgatg ttgacaagg agtgctgctg 15600  
 gattggacca atcaagccaa tcgcttttgt ctcgaggagt tttgtgacat ggttcaacgc 15660  
 ttcgatact tcttcacttt tggctctttg ccacgagaga agatcaattg atgtgaaaga 15720  
 gacgtcccgg gtgaatggca gcatgtcaag tctgctgttt tgctccaggc cttttttcc 15780  
 aatctcaaca aatctgccga attcggccat gcagtcaaag cttgcttgga ggagttgacc 15840  
 tgccaatgag tttagaacga catgaacgcc aagtcgccc gtgtaggctt tgatgccgtc 15900  
 gacgaataag tcattcctgc tcgagaagat atgatccgga ttgatgccga atttatcgcc 15960

gacaaaagtca cgcttggctt gagttcccgc tgtgacgaag acctcggcac ccgcaagctg 16020  
 ggacaaaatg atcgctgctt gaccgacgcc tccagctcca ctgtggatca agactctttc 16080  
 gcctcgtcgt agctttgccg tggatataag cgcaatatat gcggtagtga aagccagggg 16140  
 gaccgaagcg gcttctggga agcccatttc gtccggaata cggacgacat tagtgtacgg 16200  
 cgtctgtgtt ctggtcgccc aatggccttt cagtagtgca catacgcggt cccctaattc 16260  
 gaggccttgg ctacgggcag cagctccacc gagctttgtg atcactccgg cgcatcga 16320  
 gcccatcaca cggttggcct ccaattgacc catggcaacc atgacatccc gaaaattgag 16380  
 accgaaagct ttgggttcga tttctacca atcatccgga agatccttgc cttcacgtcc 16440  
 ttcgtcgtct cgaaattgca gggagtctaa gagccctggc gtctcaacct ccatccgcag 16500  
 acgacgcccc gggtgctcga acggctgcag tgtgacctca accgcttctt ggtccttcca 16560  
 gtgcgggtca ttgaaaagtc gcggtacgtg gatgacgccg tttctctctg caaattcaaa 16620  
 ctcttctgtc tcggaaaggt cgccgaggcg gccattgaag atattgcaga tagcatacag 16680  
 ggactcgtgg gtgtatgcgt ttcgagaagg atcgagatcc aacgatacat attccttccc 16740  
 gttattttcg ttgcggatgg tacgcagcag accaatatgt agagctttcc atggatcctc 16800  
 ggagctcatg gctgctcctc tagacacca gagaagtgcg ttgcagttat tcagcatcgc 16860  
 ggtgatggat ttgaaggctc cgcttcccac ctctccaagg agcgaggact ccatttcccc 16920  
 aagaaaaatg catgtccttc cagtggatc tacctcgccc agagcgttga tcgatgggct 16980  
 agaactggtc ttttcacaaa ttgctgcctg gagactttcc agccaagatg aaggaggtcg 17040  
 gagcgctccg tgcagcaaaa gcacctcga ttctgccact gtatccgggg ttgtattctc 17100  
 tttctagcc gtcgatagca ttgtgtgat catgtaaaac tcctcgtctt cacaatcacg 17160  
 aacctccaat tccacaccgt tgaaaccgct cgtgtccaac atggtgttcc aaagatcggt 17220  
 agtgagcgat ggcgtcgact tccgctcagg ctctcactg agccaccaac ctggcaacag 17280  
 tccgaaggta aagaacaaat cgagctgac cctggtagtc tcaacaaaaa tcaagttgcc 17340  
 cccaggcttg agcaattttc gaacgttact cagtgttcgt ttcatgcac gagttgcatg 17400  
 caggacctgg caagccacga ccacatcgta ggtggcacat tcaaaccctt gttgctcggg 17460  
 atcgctttca atatccaatt ttttgaaagt catcacgtct tgccaatccg caaattgctc 17520  
 acgcgccgac tcgaaaaacc cggcagacac atcgggtgaag tcataacgat cgatcggctt 17580  
 ggtgtttccc aatgcattga caataagctt tgtgcagccg cccgtgcctc cgccaatctc 17640  
 caaatgcga gaacgcgggt tcttgtgggc gcaaagtcgg atcagctcgc tggcttgtgc 17700

gtttgatcgg ctccatttga ttgcgttgac gtagtatctg cttagcagct gatcttgcac 17760  
 catcaactca agtggctctg tttcgcggcg tagcattgct attaaactgag gtcctagacg 17820  
 agaaatcatc tcgccattga cgctttctcc agcgactctg gcctgtaggc atttcttctg 17880  
 ctcagcatcg tcacttagcc agtcgcaact ggctgggctg agcttggttt gtctcgcaag 17940  
 gtccaattgg acattcatcc aatcgaaata cttctgaagg tggccatcca gatgttggat 18000  
 atcagaattt gtcaaactcag tgacagcctc ctgtataaag ttgatcgtgc atcttcggag 18060  
 gtccatcatg agttccgttt ctttcgtctc agcctcagtg ctcaactttt ctttgagcca 18120  
 agtggagtca cccaagctga tgtcaggggc ccaaaccag gagctgcagg cattttctgt 18180  
 gtcgttggag tctgactttt ggtagagaa gctgcttcca accgactgga aaacaaggcc 18240  
 ttcaatctct atgactggga ttccgtccga gggagaagaa ccgctatcat agtcatcaaa 18300  
 cactgccaaag tcggtagaga aggattgaga gttgcgatcc ttgatgctgg cctgtgcgtc 18360  
 cagagcatca ccagcctcca agtcagccag gctagaggat attttgacat ttcttagcct 18420  
 ccttggtacc atggccgttt tcatacgtgt tcccgcgtag ggtaacaccg tgtatgccgc 18480  
 ctggatcacc gagtccagag tagtaggatg gacgatgtgt cgattctcgt acgagtgagg 18540  
 catagccgag gcagtgtcag caatggaaaa tctgcaaaac gagccctgtc cattgttttg 18600  
 aattcgctga atgttctgaa aaatgggtcc gtggcatatc ccattcgct gtaaggactc 18660  
 ccagagatcg ttgggatcaa tgctccggtt atctgagcct agattcaacc tgcgtgaggc 18720  
 ttccacagtt gaacagtcaa ggtggcttct ttcgtctcc gaacgtatta atccggtgca 18780  
 gtgttctgtc caggtattat tttcgcccga aattgagtgc acagaaaatt gatgccagtt 18840  
 ctttgtgccg agggaccttt cctcacatga acggatcgtt aggcgcaggc caacctctgc 18900  
 ttctgcatca gcgggtatta tgagagcctg cgcgagttca acgtcacgca agttgtagtt 18960  
 gatgctagcc cccgcaactg gtgggcagac ttgtgaaaac ccctcgatgg ccatgctgat 19020  
 gaagccagct cccggaaaga tgatgctcga accaacgacg tgatctcgta tccatggaat 19080  
 atctgacaga cggagaacat gtttccattt aggcgcgaaa tgaggagaga gagattcccc 19140  
 tgagcctatc aaagtgtgag gcggatgggt tctctgtttg gactcacgac tgccgcgagg 19200  
 ctctctccaa taacgggttt ggtgattcca cgggtacgcc ggcaaactgc tcagtacctt 19260  
 cactctgggc tctttcttc catgaggaaa gtttatagcg tccattttga gcccataacc 19320  
 cttgcttata aactccgtag cagcacgata cattgtctcc aacgagcttc tgccgcgaga 19380  
 aaggcaactg agatagttta tatctgttcc tttagaccc agatcctgca tgacttggtt 19440



gattggacca ccaagcgctc cgtgaggccc tatttcaata atcacatcga cggctttctc 19500  
 tttggtgttg ggatcaaagc acatctcgcg gagtgaggac tcgaactcta ccggctgtag 19560  
 catactatcc atccagtgtg tgggatccaa tagcaattta agatcgggtca tgcgactacc 19620  
 agtcttaggt gatgaatata atacaccctt tgagggtgtca gcattgggat tgtcgttggtt 19680  
 gttatccgag ttgaacagat ctctcagtga cgccccaag gcctctgcca ttggtcgcat 19740  
 gtggcttgaa tggaaggctt cagtgacttt cagtttcttg gtaaagatgc catcggcgtg 19800  
 taacaacttt tcaagtttct cgattgcacc caaatctccc gacaccgtca cactacattg 19860  
 actgttgata catccaacca ccacacagcc gtcctcctgg ttgagacgag aaatgtaaac 19920  
 attggtctca ctgcgaccaa gaccacccgc catcattcct cctttggctg ccaatgcggg 19980  
 cttgggctta gtggtcaata caccgcgtat ataagtgtc ccaatggccg accgcgcgga 20040  
 taaagcccca gctgcgtagg cagcagcagc ctctccactt gagtgactgg ttatccccgt 20100  
 tggccgaatt ccccatgacc aaaggagacg cacaagtgtc atttgatag cggttgacag 20160  
 tggtagactg tattcggcat catttaccgc agtcgtcagc tcatcacggt ggagctcctc 20220  
 tgtgcaattg aatgttagta cctcaagctt gatacagtat tacttttccc gggctcgcaa 20280  
 cttaccata aaattccaac tcgcgccag ttgcttgatg tagccatcac attcaagaat 20340  
 cgctgtttg aatactggga atgtattgac cagctctctg cccattgcat gccactgcgc 20400  
 cccctgaccg gtgaatacaa atccgagccg tactttctca ttcgctcggt ttggttgatt 20460  
 ggactcatcg ctgagggcag aaacaaggcc gccaaaggctg tctgctacat acactgacgt 20520  
 ccatggcaga atggaacggc gagagcctag tgtataggcg aggctggcga ggaagggttc 20580  
 cccgtcaatg tcagcgacgg atttaattgt gtctcgagg cttgctatcg ttcgccgaca 20640  
 agcttgctcg tccttggcac gcacaacgtat tatgcggctc tgtttggaac catcctcaac 20700  
 cctaccatgc tcagagttac cattgacatg cacttgatcc tctggcaggg ccaatgatgc 20760  
 gcgatcatat gattccaaaa tgacgtgagc attcgaacca ccaaagccga agttattgac 20820  
 agatgcgcga cgagtcccat ctttcacagg ccagtcttga gcagacatgg ggatctttga 20880  
 aacattaacc tttgaaacat ataactgaat ctgcgaatgc gcaaagcctt accttgatgt 20940  
 tcttttggtc aagcatcagc ttgctgttct tttgcaggaa ccgcgcatta gggggaatca 21000  
 agcccttctc caaggccaag gccaccttga ttatactggc caggccactg gcggcttctg 21060  
 tatggccaat atttgctttc acagagccaa ggtgcagagg atgtccttta aaagctgctg 21120  
 aaattgctga gatttcaagg gggtcaccag ttggtgttcc agttccgtgg gcctccacgt 21180

acgagggtcaa cgacatatct agcccagcct tatcgtaaca ctcttgatc agacttttct 21240  
 gcgccacatc actcggcgca gtaattgcgg gtgttttgcc atcctgggtc agcgctgtct 21300  
 ctggaatgac ggctcggata gggctcttggc ctcgcaacgc gttagggagg gcctttatta 21360  
 ccagagcggc aattccttcc ccgcgaccat atccattcgc tcgaggatca aaagagtacg 21420  
 agataccatc cggggacaaa aatctgtcat tgagcaacaa ggattgctta gttcaagact 21480  
 ctcgatctgg aatcttcttc ggaaaactca ccccagggtt gacatcgtaa caaaaacatc 21540  
 gggattgagc agaagatttg caccgataac gatggctgta tctgactccc cagtacgtaa 21600  
 gctctggcac gccaaagtga gtgcgggtcaa tgcgtcgaa caggccgtgt caaccgtcac 21660  
 gctgggacca cgtaagtcgt agaagtgtga tatccgggtc gaaagcattg ttcctgagtt 21720  
 gccagttatg aaataacgcg gaactgtctc ggggtcacga ttgagcgaat cctgatagtc 21780  
 gtggtacatg acacccccaa acaccgacgt attagagcct gccataccat cgatgggtgat 21840  
 accggctgga tgatggtcag tgacgtttgc ttacagttag gatgaccac actacatacc 21900  
 actctccagc gattcgtaga ccacctcaag cataagccga tactgcggat ccatgcactg 21960  
 tccaatatta gatctctgcg tcccgggtta gatcaattga aataatcata cgctggcgac 22020  
 ctctgtggtc atgttgaaga acgcggcgtc aaataaagca ggatcctcgt cgatgaagtg 22080  
 tccacccttt acgtgggtct atccagtcct ccttgagtc agtaaccaag cttcagtgat 22140  
 gctcaaactt tgtgtcaaat attcaaaaca agatataaat gcatgcatgt tagatactca 22200  
 cggaccgcgac cctttcgcca ttcgggtggc atactcctct cacattgaat cgcgaggagg 22260  
 ggaccttaga ccaggcactg cctcctcttt caaccatttc ccaaagcttc tgtggactcg 22320  
 ttgcatctcc agcaaatcga catccattc caactatggc aatgggcgtg gatgtgttag 22380  
 agcaagccga gcctgccatt gcggttgcgg ttgcggttgc ggttgcggtt gcggttacgg 22440  
 cgggggtatt gttcattcca acgttgtttc attgactgat atatcagtcg ccctgggtgat 22500  
 aaaaccgttg atagtcttcc aacagtctac aggtccctgg catagctata gatgcataag 22560  
 ctgccccga cacgtgattc atagttcggg gtttgtttc atcttggacg tgacacgata 22620  
 ttcgctctgt gcccatggga aaccccgac caccatgcta tgctcggggc aataccttag 22680  
 aggtaccggt tcgggaggca ttgtctgtcg tcacgataat cccgagtcaa aacgccgatg 22740  
 ggaaaccgtc gaacaagacg aaacagggtc gccggccag gtagttttcg ggtataatgg 22800  
 aggctgtcag aatccgatac tccgtacaca gatgcgaaat acgcatacga gctatcaaac 22860  
 caaacgaatc caaaagcctt ggaaaagctt ggaaaggctt agtgggtaat cctgtcccaa 22920

ggtttgttga gggcctgagc gcagggtggg tcctgtaagc agttggtaat tcaatttcca 22980  
 acaatacaca atccccaaaa ttgacattat cggttgacta agacaagcaa acaaaatata 23040  
 tgcaggaagc gcaattcatc gcgagcaaac gatcatcatg agcatgtgac ctttctctct 23100  
 tttttctact tcggaaggcg gcatgatcat ctgtcagaac tccaatcgg gagcaatacc 23160  
 ataccttacg gcacccact cagacccatg cacaaagaaa atccatgcgc cgaatattga 23220  
 agccttggca acaaagcccc gtgtaactcc gaaggatatcc aaagaccgag agacgccgat 23280  
 ttgagagaca cgtacggagg tccacacaaa atgttcccga gtctatacac tatactccaa 23340  
 actgacttct tgtctacctg ggtatcttgt tcaggttgct gtttactgag ataaatgata 23400  
 ccggggggggg gggggggggg ggggggttgac actggctttt cgtggacaga ataataccca 23460  
 tacatccctg cgtaagtagt cgtttcgaga agaatgtgtt tcgtgggtgca ttactccgta 23520  
 ggcacaatat atttccattc ctcacgaagt ggcctcgtcc gggcgtgatc gatgcagctt 23580  
 gccgccccac caaaaaagga ccacaatacg agtcagatta gaaacgtcta acaggacgtc 23640  
 tatgtaagag gacgctcctt tgtatgtcgg atctaggcat gacaaaataa ctatacctag 23700  
 gtagtgttct gtcttattgg tcatttggcc tactttcgga acaatcttgg aagttcacat 23760  
 tcctaggtat cagggaatt gattgggtgc cccagaattc tttttctcg aataaaggat 23820  
 aaatttatgc ataaaaacct tggaaactga gcatagttat gagcacaat actagttttc 23880  
 agtgcaattg gtcctactat cctttgcttg gtaccctta ccaattatac cctaggcagc 23940  
 agttgacacc ggtcatgaat ccattcataa aggtggacca gatgcaggga taaggaagcg 24000  
 aatctttccg ctgcctcagc ctcaggggcg cgcgccattt gttattttct tctactcatt 24060  
 tcccgtaacct aggaactgtt cagttgtccc tcccaacccc ttgggccgaa caaccttct 24120  
 ccaatctacg acggcagatt atacctaggc gcctaaccga ttaggttgct cattcgattt 24180  
 tggaggtatg cactttatct caagccctaa ttcccaattg aagtgccttt ccgtcccat 24240  
 ttgcagagct gactagattc ttttctcaga gactacctag ctataggtac cactccaagc 24300  
 tgtagcacag acctttcagc atggtcgctt cgttgctacc ctctcgcttt cgcggtaggg 24360  
 aatcaatgaa tcagcagcac cctctacgct cgggaaatcg ggcattgacc tccacactcc 24420  
 aatttctatc caaaacggcg tgtctacacc cgatccatac cgtttgcacc atagctattc 24480  
 tagctagtac cacatacgtt ggactactca aagacagctt cttccatggc cccgcaaagc 24540  
 ttgataaagc agaatggggc tctttggctg aagggaagtcg aagcttgatc accggccac 24600  
 agaatggctg gaagtggcag agcttcgacg gggatgcaga tgttctcgga gatttcaacc 24660

atcaagcact aatgaccttg gtattcccgg ggtcatatgg ggttgcattt caagcagcct 24720  
 caccattcct tgctcccctc cctgtgaacc tatctgtgat tgaccttccc tcaacgtcga 24780  
 gccctttaac cgcctattcg aaagataaag ttttcgcctt ctctgtggaa tacagcagcg 24840  
 cgccggaact cgtggctgct gttcaagaaa tccccaaaca cagtgccgac ctgaaattgc 24900  
 aggagacgca attgatcgag atggaacgcc agatgtggat catgaaggct gccagggctc 24960  
 acacaaaacg cagccttgct caatgggtgc acgatacctg gacagagtct cttgatctta 25020  
 tcaagagcgc tcaaacgctc gacgtggttg tcatggtgct aggttatata tcaatgcact 25080  
 tgactttcgt ctactcttc ctacgatga aaaaattggg atcgaagggt tggctggcta 25140  
 caagcgtcct tttgtcgtca acatttgcct ttctcctcgg tctcgacgtg gccataagac 25200  
 taggggttcc gatgagcatg aggttgctat ccgaaggcct ccccttcttg gtggtgatcg 25260  
 ttggctttga gaagagcatc actctgacca gggctgtttt gtcctatgct gtgcagcacc 25320  
 gaaagcccca gaagatacag tctgaccagg gtagcgtgac agccattgct gaaagtacca 25380  
 tcaattacgc cgtacgaagc gccattcggg agaagggtta caatatcgtg tgccactacg 25440  
 tggtcgagat cctgctccta gttatcgggtg ctgtcttagg catccaagggt gggctacagc 25500  
 acttctgtgt tctagctgca ttgatcctgt tctttgactg tctgctgctg tttacattct 25560  
 aactgcgat tctgtctatc aagctcgagg taaaccgcct caaacgtcat atcaacatgc 25620  
 ggtacgcgtt ggaagatgag ggtctcagtc agcggacggc ggagagtgtc gcgaccagca 25680  
 atgatgcccc agacagtgca cgtacatata tgtttggcaa tgatatgaaa ggcagcagtg 25740  
 ttccgaagtt caaattctgg atggtcgttg gtttcttat cgtcaacctc gtcaacatcg 25800  
 gctccacctt ttccaagcc tcttctagtg gatcgttgct cagtatatca tcttgaccg 25860  
 aaagtctgag cggatcggcc attaaacccc cgcttgagcc ctccaaggta gctggaagtg 25920  
 gactagatga actacttttc caggcaagag ggcgcggtca atcgactatg gtcactgtcc 25980  
 tcgcccccat caagtacgaa ctagagtata ctccattca ccgtgggtacc tcgcagctac 26040  
 acgagtatgg agttggtgga aaaatggctg gtagcctgct caccagcctg gaagatcccc 26100  
 tcctctccaa atgggtgttt gtggcacttg ccctaagtgt cgctctgaac agctatctgt 26160  
 tcaaggccgc cagactggga atcaaagatc ctaatctccc gagtcacca gttgatccag 26220  
 ttgagcttga ccaggccgaa agcttcaacg ctgcccagaa ccagaccctt cagattcaat 26280  
 caagtctcca agctcctcag accagagtgt tcaactctac caccaccgac agtgacagtg 26340  
 atgcctcatt agtcttaatt aaagcatctc taaaggtcac taagcgagca gaaggaaaga 26400

cagccactag tgaacttccc gtgtctcgca cacaaatcga actggacaat ttgctgaagc 26460  
 agaacacaat cagcgagttg aacgatgagg atgtcgttgc cttgtctttg cggggaaagg 26520  
 ttcccgggta tgccctagag aagagtctca aagactgcac tcgtgccgtc aaggttcgcc 26580  
 gctctatcat ttcgaggaca cgggctaccg cagagcttac aagtatgctg gaggactcga 26640  
 agctgccgta cgaaaactac gcctgggaac gcgtgctcgg tgcattgtgc gagaacgtta 26700  
 ttggctatat gccagtcctt gttggcgctc cgggtcctat tgttatcgac ggcaagagtt 26760  
 atttcattcc tatggcaacc accgagggcg tcctcgtcgc tagtgctagc cgtggcagta 26820  
 aggcaatcaa cctcgggtggc ggtgccgtga cagtcctgac tggcgacggt atgacacgag 26880  
 gcccggtgtg gaagtttgat gtccttgaac gagctgggtc tgctaagatc tggctcgatt 26940  
 cggacgtcgg ccagaccgta atgaaagaag ccttcaattc aaccagcaga tttgcgcgct 27000  
 taaaaagtat gcggacaact atcgccggta ctcacttata tattcgattt aagactacta 27060  
 ctggcgacgc tatgggaatg aatatgattt ctaagggcgt ggagcatgca ctgaatgtta 27120  
 tggcgacaga ggcaggtttc agcgatatga atattattac cctatcagga aattactgta 27180  
 cggataagaa accttcagct ttgaattgga tcgatggacg gggcaagggc attgtggccg 27240  
 aagccatcat accggcgaac gttgtcaggg atgtcttaaa gagcgatgtg gatagcatgg 27300  
 ttcagctcaa catatcgaaa aatctgattg ggtccgctat ggctggctca gttggcggt 27360  
 tcaacgcccc agctgccaat cttgcggcag ccattttcat tgccacaggt caggatccgg 27420  
 cgcaagttgt ggagagcgt aactgcatca ctctcatgaa caagtaagtt gaaagcggcc 27480  
 gcttacttgg aaacattcac taatcctgtt tagtcttcgc ggatcgcttc aaatctctgt 27540  
 ctccatgccg tctattgagg ttggaacgtt gggcggtggt acgattctgg agccccaggg 27600  
 cgcaatgctt gacatgcttg gtgtccgcgg atcacaccg accactcccg gtgagaatgc 27660  
 acgtcaactt gcgcgcatca tcggaagcgc tgttttggct ggggagctct cgctatgtgc 27720  
 tgccctagcc gccggtcacc tgggtcaaggc gcacatggcg cacaaccgtt ctgccccggc 27780  
 atcttcagcc ccttctcgaa gtgtctcccc gtcaggcgga accaggacag tccctgttcc 27840  
 taacaatgca ctgaggccga gtgctgcagc tactgatcgg gctcgacgct gattaggtcg 27900  
 gaatcttagg agcattccaa gctccgtacc ccctccagtg gattcattgc aggaggatca 27960  
 tattttttct cattggttgt tattgtcata attttcaaaa gcacaatgca atgagacagg 28020  
 caggtggtag agtgaacggc cagaaagggt atctcatgtt tatatgttgt tgaaatttac 28080  
 gatgcaagta gtagggaaga agaatatata aagagatggt cttttccag agagtgttta 28140

ggtctgatcc ctcataatta tttaatgagt gaaagctttg ttcaagctat aacttactga 28200  
 gtaggttgaa tgttgatctg attcattcct gaggtatcag gattgatgcc tgaacatca 28260  
 atcatccatt gtcagatgcc gtaactaact aactatgaat ctcaacatag ttatatgttg 28320  
 ccaatctagc cacggtgact agaaccttga gatggactta gactagacat gggtcgcggg 28380  
 caatgacata tagaatcttt gaaatcgaca ttaattaagt atgtggagat tctttgtgga 28440  
 ggcacggtaa tgtgtctatc tagcaacgcg gtcaagcatc agtctcaggc acagcccggg 28500  
 tgtcgttttt ggttgcaatc ttccgccatc ccattccaaa ggcaaacaca aacgtgcacg 28560  
 ccgtagctcc cactgctaag taaaaagtat gatcaacggc gagactgtaa gcttttacia 28620  
 cccctggaag gttattcttg ctgaccacat ctctgaagcc agtcgcccct gctgccgtca 28680  
 cggcctgcgt gtcgacagtg ggcgcatact tgctcaggcc agttctcaaa ccggacccaa 28740  
 agacaagggt agcaaagtcc aggaagagcg atcctccaaa cgtctgtcca aacacggcga 28800  
 gagaaattcc gagggcacct tgttcgggcg aaagcgtgct ttggatggcg atgataggct 28860  
 ggccattgag tattgatgtc agcgtctagc ggttgcatgc tcttcttgct ttgatacaaa 28920  
 gccgaaagcg tgagagatga tcaaagggtt catagcttac cgtttgcatg ccacaaccac 28980  
 gaccgaagcc cgcgataaat tggatcatga cccatttcac agttgatgta tggggctgga 29040  
 aggtggatac cagacctgcg cctatggcga cgagaacagc gctgcctagg gcccaaggca 29100  
 aatagtatcc tgtctttcca actggtgcgt catatgtcag tatacacgat atccaagccc 29160  
 gatgtcagac ggttgtggca agaaaggagc catagaaatg gacgggggtg agaaaaatgt 29220  
 gtacgcgagt ttcacttact tgcgaagcca gaaaccatag ccataatgac ttgtccaaga 29280  
 attccaggca acatgtacac accactcagt gtgggagaaa catccttcac agcctggaag 29340  
 tagatcggtg gatagtagga aaagacaagc aaggagccag agaaaaagcc cataaataaa 29400  
 caagagcacc acacttgctg tttaccagcc actgagccag gaatcatggc aacagcatcg 29460  
 ccaacatgac gtccccatag cacgaacgca atcagagcaa accctccgcc acagaacagg 29520  
 ccgatgatga cggaacttcg ccagggtgtg gtcgaccctc cccattctag tgcgagggaa 29580  
 atcatgggtg cgaaggctgc aaagaccaca aagcctacaa ggtccagttt gcgaagtgtg 29640  
 gattttatgt tggccattgg tttgtcggtc gagagttcgc tgtccgtgga tgaattcgg 29700  
 tcgggtatgg tgatgacgag aaggaggaat gcagcgacag cgccgatggg gagattgata 29760  
 taaaagcctg aattccaagt gagaacatgg acaacaatca taaaaggcc aaaggtcaac 29820  
 atacaccatc gccaaagtgc gtgttgagtg aaagcacctc cgagcagtgg tccacagaca 29880

atggcaatct gactaactga aaacatattg tcagacgacg aaccgttcgt ttgggggtaca 29940  
 tcagatcttg agatgacata cgacccatca tcactccaat caaaacttca tatgcgaggt 30000  
 cagcgtgtac acggcaccca gcagacttcc aaaaatcggt tcccttacct ggttgcttgt 30060  
 gcttaggagc agctgttgag aggattgtga gggctccgtt gacaagacct gagcctccca 30120  
 ttccagcaac ggcccgccta acaatcaaca tgggtgaaga tcttgcgga cgcgatagca 30180  
 ccgagcctag ttcaaaaata cagaggaagg caaagaaagt gtacttcaag cccaagagtg 30240  
 tatacaattt accggccagg ggctggagag cacagctaaa tatgatgtta gctaactctgt 30300  
 tcgtacaatg aacaaggta aggagaacag agccatactt agccagaaga taagcactgc 30360  
 cgtaccaccc tacatcgctt agagagtga actcgcttgt gatatgtggg attgcctgtg 30420  
 gctggagtca attgactgtg ctgcgctctg ttctgaggta gccacatct taccgtgacg 30480  
 ataatggaca tatcaaggag catcaaaaat gctacgaaag taactgaagc aaccaccagc 30540  
 ccgagcttga ggctgtgat gtgctgggac ttggactcag tcgcttcgag cgtgtcattt 30600  
 tgactttctt ccttctgttg ccttggttcc cttcttttag ggggtagagg ttctgacatc 30660  
 gcgcaattcc ttccgacttt tgcttcaagg ggcggtgtga atctctactg cgcggcgctt 30720  
 ctatagtacc tgtgttttgg tgtatgaatg atctcgctct cgttgtttcg ttaagggtccg 30780  
 ctagcctgaa gtcagattga tggatgggga tcaggggaaa ttggcgacgt ctttaatttt 30840  
 gcttttcttt gttaccggaa gtgttgcggt attagcgtgt ctgggcttat ttacgacgca 30900  
 caagatgcat tgaactggcc cactgctag atctcactag tattgtgggt gtaatttacc 30960  
 tatactccat attgactggg caggttttga acacaacca cccccccca tactacacat 31020  
 tagttttgca tattttcctg ggggccaaaa aaaccccaa aggccttcaat attttgcggc 31080  
 caatggagag tgtaactaat ttggcccaca ctccggtggt atcaatcgga tctcactgca 31140  
 tatatgatga aagcaagagg gggcaggaga tacgctcttt attggctgtc tgcgcgaagc 31200  
 tgggcaaagc caaataaaaa gacaaacaac cagctggaag accgggcgac aaacatgggt 31260  
 tacctaacac cctcgatccc aacaatgtgc atgttaatca atgtgctccg tggggagtat 31320  
 gaactataac atacgaagca gccattcatg tcaaaaaaaa aaccaggcga atgggcgtcg 31380  
 tcaacggttt cacataagta ctatattgta ctaactacc gtgagactgg agagaacagt 31440  
 ctgcgcgaa gaaacgataa gagcatcggt catatcggtc catctcggtc taagtgtatg 31500  
 agaattattc gagtgtaat catccgtcag tgatcaatgt ctccaagtaa ttcatcattt 31560  
 caattaccct cgctttactc cgtagaatac aagacctac tagcgcaaac aagtgggggc 31620

taacgggtgtg atctccttcc gttgcggccg ccacctcggt tccagccgta atacgacgac 31680  
ccgtctatcg cgacccccta gccttggcca tttttggcgt tacagtaaag ctttggagag 31740  
aaacgccaaag ggaaaatgct agccaccaat tctataaatt actcttcaca tgcagctagt 31800  
atcactggta agtctacggg gcacatgtaa aatTTTTtatt acttttctaataaatcttttcca 31860  
agttctttttc cacggggccc caatgcttaa aatactcaaa agacgtgaaa aacctgcaag 31920  
ccgccagtga tatcacacgt aatgcctcaa cagcctgatt ccgagccatt atatgctgtt 31980  
tgatgatctc aaattgagat ggcgagcgtt ggatctggga aattggtagt gggattggta 32040  
tagaaacgta agtgcagaag accatgtaat aagtacatat ggaggctatg tgatggccccg 32100  
atctagtttc ttcaatatag cgctgggtat aaaaaaagc aggggctttc tcagggtaat 32160  
gtcgcagtct acaacgagtg gcgtccactg acagggaag gcgagcgggg ctatgctacc 32220  
ttcaatttcc atagaggggg gatgcacat ctccgacaat ctatagttac tcaaacaggt 32280  
acggtactaa gcaatattgt gtttcttcgc taatgcgaat atttccttat agcaacgtcg 32340  
caacacattt atcgtcttcc ctgaggcctt tgttgacttg ggctcttcgt ctccggcttc 32400  
gtcactccaa agcacagata ggagacgaga ggccggcggtt atggttttat ttcagcgcc 32460  
aaggatttgc cacgatgtgc ttggcatatc tgataggacc tattccccct ctcccgtca 32520  
gcgcattgct gatgtatgca agggaagaaa agactgggtg ttatcggtcc cacttactag 32580  
acgaatagat gccgcagccc cgtgctcctg tgctatcccc aaagcagtct caatctcact 32640  
caatagtcga aggccttacac gcaatgtcgt gcatgcagaa gataaggcgt gcatgaatgg 32700  
gtcgagatgt gaaatgagct cgccgatatg aagattagag tgaaacgagg gaagtgttc 32760  
ggctcttcca ttgtcatttc tagtggttga gccagaccag taccaatcca ttcgtgtgct 32820  
ttgcttttgt ccacaagggtt gggctttcat cacctcggt agtagcagct gggaaagtga 32880  
tgtcatgatt ttgacagaca acatgtagca atgcaccgcc atgaacaagt tcttggtttg 32940  
cagacacca tctaacatgc tgctattgct gtcgtgatc acacgttctt gaagatgtag 33000  
tagcaatcta ccaaaggcat tcaaaaagtc ccctatcggg tctaggaaga agcttttagcg 33060  
acaatcaaga ggcagtaaag aggcagaatt gaaaatctca cagcttaaaa ttttttgctt 33120  
gggccattcc acagtcaccc cgtggagtat tacctctagg tcctgtgaca catccgacag 33180  
actttcgaaa aggtctcgtt gcgtgttgct tgtgttggt tgtccgatg acgagttccc 33240  
ctctacttcg aggtcaaaca gcgatggcga gacaggcgcc gttgcatcca aagggccttc 33300  
aaagtcgtag cctagatctg gtatccccga agattcattg ctgttggcat cgtcgcgaaa 33360



tgtatttggc tgaggccagc cgccgggaaa cgactcggga tcatcaaagt tgattgatgt 33420  
 atcatagaat tgcagggttg ccgctgatgg ttctgataat gtttccttga gtgccgaggt 33480  
 gccaatatgc gtaggtggtg agcagtaagg tggaggagtc tctgccaatg atgagaagac 33540  
 cgtagaagat gtcgcggtca tcggttgtga ggtttctgtg gctctttagt ttccagctgc 33600  
 ggcttcttta tgtaaattgc gcttgggtag cctttcgctg tacacacacc ttaatccggc 33660  
 ttgttgacaa cgttgacact gagcacggac taaattggca ttgctaccgg tacatttgag 33720  
 cttttgtgca tgacaccggt cacatgagcg tcgaaacgcg cgacggcgta ggttcgtcgg 33780  
 aatcgttgca tgcggcaggg acataattat tggattaaga tcaaataatg tgaggtgaga 33840  
 ctttgcattg tcctggatct ttatgtattg gaattggaga gtaagctcgt gcaggagata 33900  
 agttcaggtc gtcttgctgg aagacttact aagttatatg caaacaagtg ttttcgagcg 33960  
 gacacaaaaa gccaatagtc ttactatgaa tgtcttttca gtcacccgga gaaatactct 34020  
 tagcctctgc tcttatgcga gctcatcaaa gctgggcata catacccat ccagcggcac 34080  
 gtattacact agaaagagtt ctaaaagaaa tagattcggc ccccatctg gctatcatat 34140  
 atgccagatg aaatacctgt aacgtggggc ataaaaaggc aggctctagt ctaccagcag 34200  
 atc 34203

<210> 2

<211> 34203

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 2

gatctgctgg tagactagag cctgcctttt tatgccccac gttacaggta tttcatctgg 60  
 catatatgat agccagatgg ggggccgaat ctatttcttt tagaactctt tctagtgtaa 120  
 tacgtggcgc tggatggggt atgtatgcc agctttgatg agctcgcata agagcagagg 180  
 ctaagagtat ttctccgggt gactgaaaag acattcatag taagactatt ggcttttggt 240  
 gtccgctcga aaacacttgt ttgcatataa cttagtaagt cttccagcaa gacgacctga 300  
 acttatctcc tgcacgagct tactctccaa ttccaataca taaagatcca ggaacatgca 360  
 aagtctcacc tcacattatt tgatcttaat ccaataatta tgtccctgcc gcatgcaacg 420

attccgacga acctacgccg tcgcgcgttt cgacgctcat gtgaccgggtg tcatgcacaa 480  
 aagctcaaat gtaccggtag caatgccaat ttagtccgtg ctacagtgtca acgttgtcaa 540  
 caagccggat taagggtgtg gtacagcgaa aggctacca agcgcaattt acataaagaa 600  
 gccgcagctg gaactacaag agccacagaa acctcacaac cgatgaccgc gacatcttct 660  
 acgggtcttct catcattggc agagactcct ccaccttact gctcaccacc tacgcatatt 720  
 ggcacctcgg cactcaagga aacattatca gaaccatcag cggcaaccct gcaattctat 780  
 gatacatcaa tcaactttga tgatcccgag tcgtttcccg gcggctggcc tcagccaaat 840  
 acatttcgcg acgatgccaa cagcaatgaa tcttcgggga taccagatct aggctacgac 900  
 tttgaaggcc ctttggatgc aacggcgcct gtctcgccat cgctgtttga cctcgaagta 960  
 gaggggaact cgtcatccgg acaatccaac acaagcaaca cgcaacgaga ctttttcgaa 1020  
 agtctgtcgg atgtgtcaca ggacctagag gtaatactcc acgggggtgac tgtggaatgg 1080  
 cccaagcaaa aaattttaag ctgtgagatt ttcaattctg cctgtttact gcctcttgat 1140  
 tgctgctaaa gcttcttctt agacccgata ggggactttt tgaatgcctt tggtagattg 1200  
 ctactacatc ttcaagaacg tgtgatcacg agcagcaata gcagcatgtt agatgggtgt 1260  
 ctgcaaacca agaacttggt catggcgggtg cattgctaca tgttgtctgt caaaatcatg 1320  
 acatcacitt cccagctgct actatccgag gtgatgaaag cccaaccttg tggacaaaag 1380  
 caaagcacac gaatggattg gtactgggtc ggctcaacca ctagaaatga caatggaaga 1440  
 gccgaagcac ttccctcggt tcaactctaat ctcatatcg gcgagctcat ttacatctc 1500  
 gaccatttca tgcacgcctt atcttctgca tgcacgacat tgcgtgtaag ctttcgacta 1560  
 ttgagtgaga ttgagactgc tttggggata gcacaggagc acggggctgc ggcattctatt 1620  
 cgtctagtaa gtgggaccga taaccaccag tcttttcttc cttgcatac atcagcaatg 1680  
 cgctgaccgg gagaggggga ataggtccta tcagatatgc caagcacatc gtggcaaadc 1740  
 cttggcgtg aaaataaaac cataacgccg gcctctcgtc tctatctgt gctttggagt 1800  
 gacgaagccg gagacgaaga gcccaagtca acaaaggcct cagggaagac gataaatgtg 1860  
 ttgcgacgtt gctataagga aatattcgca ttagcgaaga aacacaatat tgcttagtac 1920  
 cgtacctgtt tgagtaacta tagattgtcg gagatgggtc atccccctc tatggaaatt 1980  
 gaaggtagca tagccccgt cgcctttccc tgtcagtgga cgccactcgt tgtagactgc 2040  
 gacattaccc tgagaaagcc cctgcttttt ttataacca gcgctatatt gaagaaacta 2100  
 gatcgggcca tcacatagcc tccatatgta cttattacat ggtcttctgc acttacgttt 2160

ctataccaat cccactacca atttcccaga tccagcgctc gccatctcaa tttgagatca 2220  
 tcaaacagca tataatggct cggaatcagg ctgttgaggc attacgtgtg atatcactgg 2280  
 cggcttgagc gtttttcacg tcttttgagt attttaagca ttggggcccc gtggaaaaga 2340  
 acttggaag attattagaa agtaataaaa attttacatg tgccccgtag acttaccagt 2400  
 gatactagct gcatgtgaag agtaatttat agaattgggtg gctagcattt tcccttggcg 2460  
 tttctctcca aagctttact gtaacgcca aaatggcca ggctaggggg tcgcataga 2520  
 cgggtcgctg tattacggct ggaaccgagg tggcggccgc aacggaagga gatcacaccg 2580  
 ttagcccca cttgtttgcg ctagtaaggt cttgtattct acggagtaaa gcgagggtaa 2640  
 ttgaaatgat gaattacttg gagacattga tcactgacgg atggattcac gtcggaatat 2700  
 tctcatacac ttagaccgag atggaccgat atgaccgatg ctcttatcgt ttcttcgcgc 2760  
 gagactgttc tctccagtct cacgggtagt tagtacaata tagtacttat gtgaaaccgt 2820  
 tgacgacgcc cattcgctg gttttttttt tgacatgaat ggctgcttcg tatgttatag 2880  
 ttcatactcc ccacggagca cattgattaa catgcacatt gttgggatcg aggggtgttag 2940  
 gtaaaccatg tttgtcgccc ggtcttccag ctgggtgttt gtctttttat ttgcatttgc 3000  
 ccagcttcgc gcagacagcc aataaagagc gtatctcctg cccctcttg cttcatcat 3060  
 atatgcagtg agatccgatt gataccaccg gagtgtgggc caaattagtt acactctcca 3120  
 ttggccgcaa aatattgaag ccttttgggg tttttttggc cccaggaaa atatgcaaaa 3180  
 ctaatgtgta gtatgggggg gtgtgggttg tgttcaaac ctgcccagtc aatatggagt 3240  
 ataggtaaat tacaaccaca atactagtga gatctagcag tggggccagt tcaatgcac 3300  
 ttgtgcgtcg taaataagcc cagacacgct aataccgcaa cacttccgtt acaaagaaa 3360  
 agcaaaatta aagacgtcg caatttcccc tgatcccat ccatcaatct gacttcaggc 3420  
 tagcggacct taacgaaaca acgagagcga gatcattcat acacaaaac acaggtacta 3480  
 tagaagcgcc gcgcagtaga gattcacacc gcccttgaa gcaaaagtcg gaaggaattg 3540  
 cgcgatgtca gaacctctac cccctaaaga aggggaacca aggccacaga aggaagaaag 3600  
 tcaaaatgac acgctcgaag cgactgagtc caagtcccag cacatcacag gcctcaagct 3660  
 cgggctgggtg gttgcttcag ttactttcgt agcatttttg atgctccttg atatgtccat 3720  
 tatcgtcacg gtaagatggt ggctacctca gaacagagcg cagcacagtc aattgactcc 3780  
 agccacaggc aatcccat atcacaagcg agttccactc tctgaacgat gtagggtggt 3840  
 acggcagtgct ttatcttctg gctaagtatg gctctgttct ctttgacctt gttcattgta 3900

cgaacagatt agctaacatc atatttagct gtgctctcca gcccctggcc ggtaaattgt 3960  
 atacactctt gggcttgaag tacactttct ttgccttcct ctgtattttt gaactaggct 4020  
 cggtgctatg cggtgccgca agatcttcca ccatgttgat tgttgggcgg gccgttgctg 4080  
 gaatgggagg ctcaggtctt gtcaacggag ccttcacaat cctctcaaca gctgctccta 4140  
 agcacaagca accaggttaag ggaaccgatt tttggaagtc tgctgggtgc cgtgtacacg 4200  
 ctgacctcgc atatgaagtt ttgattggag tgatgatggg tcgtatgtca tctcaagatc 4260  
 tgatgtaccc caaacgaacg gticgtcgtc tgacaatatg ttttcagtta gtcagattgc 4320  
 cattgtctgt ggaccactgc tcggagggtgc tttcactcaa cacgccactt ggcgatgggtg 4380  
 tatgttgacc tttggccttt ttatgattgt tgtccatgtt ctcacttgga attcaggctt 4440  
 ttatatcaat ctccccatcg gcgctgtcgc tgcattcctc cttctcgtca tcaccatacc 4500  
 cgaccgaatt tcattccacgg acagcgaact ctcgaccgac aaaccaatgg ccaacataaa 4560  
 atccacactt cgcaaactgg acctttagg ctttgtggtc tttgcagcct tcgcaaccat 4620  
 gatttccttc gcactagaat ggggagggtc gacctacacc tggcgaagtt ccgtcatcat 4680  
 cggcctgttc tgtggcggag ggtttgctct gattgcgttc gtgctatggg agcgtcatgt 4740  
 tggcgatgct gttgccatga ttcctggctc agtggctggg aaacgacaag tgtggtgctc 4800  
 ttgtttattt atgggctttt tctctggctc cttgcttgtc ttttctact atctaccgat 4860  
 ctacttccag gctgtgaagg atgtttctcc cacactgagt ggtgtgtaca tgttgccctgg 4920  
 aattcttgga caagtcatta tggctatggg ttctggcttc gcaagtaagt gaaactcgcg 4980  
 tacacatttt tctccacccc gtccatttct atggctcctt tcttgccaca accgtctgac 5040  
 atcgggcttg gatatcgtgt atactgacat atgacgcacc agttggaaag acaggatact 5100  
 atttgccttg ggccctaggc agcgtgttc tcgtcgccat aggcgcagggt ctggtatcca 5160  
 ccttccagcc ccatacatca actgtgaaat gggcatgta ccaatttata gcgggcttcg 5220  
 gtcgtggttg tggcatgcaa acggttaagct atgaaacctt tgatcatctc tcacgcttcc 5280  
 ggctttgtat caaagcaaga agagcatgca accgctagac gctgacatca atactcaatg 5340  
 gccagcctat catcgccatc caaagcacgc tttcgcccga acaagggtgcc ctcggaattt 5400  
 ctctcgccgt gtttggacag acgtttggag gatcgctctt cctggacttt gctaaccttg 5460  
 tctttgggtc cggtttgaga actggcctga gcaagtatgc gccactgtc gacacgcagg 5520  
 ccgtgacggc agcaggggcg actggcttca gagatgtggg cagcaagaat aaccttccag 5580  
 gggttgtaaa agcttacagt ctcgccgttg atcatacttt ttacttagca gtgggagcta 5640

cggcgtgcac gtttgtgttt gcctttggaa tgggatggcg gaagattgca accaaaaacg 5700  
 acacccgggc tgtgcctgag actgatgcit gaccgcgttg ctagatagac acattaccgt 5760  
 gcctccacaa agaattctcca catacttaat taatgtcgat ttcaaagatt ctatatgtca 5820  
 ttgcccgcga cccatgtcta gtctaagtcc atctcaaggt tctagtcacc gtggctagat 5880  
 tggcaacata taactatgtt gagattcata gttagttagt tacggcatct gacaatggat 5940  
 gattgatgtt tcaggcatca atcctgatac ctcaggaatg aatcagatca acattcaacc 6000  
 tactcagtaa gttatagctt gaacaaagct ttactcatt aaataattat gagggatcag 6060  
 acctaaacac tctctggaaa aggaccatct ctttatatat tcttcttccc tactacttgc 6120  
 atcgtaaatt tcaacaacat ataaacatga gatacccttt ctggccgttc actctaccac 6180  
 ctgcctgtct cattgcattg tgcttttgaa aattatgaca ataacaacca atgagaaaaa 6240  
 atatgatcct cctgcaatga atccactgga gggggtacgg agcttggaat gctcctaaga 6300  
 ttccgacctt atcagcgtcg agcccgatca gtagctgcag cactcggcct cagtgcattg 6360  
 ttaggaacag ggactgtcct ggttccgcct gacggggaga cacttcgaga aggggctgaa 6420  
 gatgccgggg cagaacggtt gtgcgccatg tgcgccttga ccaggtgacc ggcggttagg 6480  
 gcagcacata gcgagagctc cccagccaaa acagcgcttc cgatgatgcg cgcaagttga 6540  
 cgtgcattct caccgggagt ggtcgggtgt gatccgcgga caccaagcat gtcaagcatt 6600  
 gcgccctggg gctccagaat cgtaccaccg cccaacgttc caacctcaat agacggcatg 6660  
 gagacagaga tttgaagcga tccgcgaaga ctaaacagga ttagtgaatg tttccaagta 6720  
 agcggccgct ttcaacttac ttgttcatga gagtgatgca gttagcgctc tccacaactt 6780  
 gcgccggatc ctgacctgtg gcaatgaaaa tggctgccgc aagattggca gcttgggcgt 6840  
 tgaagccgcc aactgagcca gccatagcgg acccaatcag atttttcgat atgttgagct 6900  
 gaacctatgt atccacatcg ctctttaaga catccctgac aacgttcgcc ggtatgatgg 6960  
 cttcggccac aatgcccttg ccccgctcat cgatccaatt caaagctgaa ggtttcttat 7020  
 ccgtacagta atttcctgat agggtaataa tattcatatc gctgaaacct gcctctgtcg 7080  
 ccataacatt cagtgcattg tccacgccct tagaaatcat attcattccc atagcgtcgc 7140  
 cagtagtagt cttaaatacga atatataagt gagtaccggc gatagttgtc cgcatacttt 7200  
 gtaagcgcgc aaatctgctg gttgaattga aggcttcttt cattacggtc tggccgacgt 7260  
 ccgaatcgag ccagatctta gcagcaccag ctcgttcaag gacatcaaac ttcacacacg 7320  
 ggccctcgtgt cataccgtcg ccagtcagga ctgtcacggc accgccaccg aggttgattg 7380

ccttactgcc acggctagca ctagegacga ggacgccctc ggtggttgcc ataggaatga 7440  
 aataactctt gccgtcgata acaataggac cggcgacgcc aacagggact ggcatatagc 7500  
 caataacgtt ctcgcaacat gcaccgagca cgcgttccca ggcgtagttt tcgtacggca 7560  
 gcttcgagtg ctccagcata cttgtaagct ctgcggtagc cgggtgtcctc gaaatgatag 7620  
 agcggcgaac cttgacggca cgagtgcagt ctttgagact cttctctagg gcatacccg 7680  
 gaacctttcc ccgcaaagac aaggcaacga catcctcatc gttcaactcg ctgatttgtgt 7740  
 tctgcttcag caaattgtcc agttcgattt gtgtgcgaga cacgggaagt tcactagtgg 7800  
 ctgtctttcc ttctgctcgc ttagtgacct ttagagatgc tttaattaag actaatgagg 7860  
 catcactgtc actgtcgggtg gtggtaggag tgaacactct ggtctgagga gcttgagac 7920  
 ttgattgaat ctgaggggtc tggttctggg cagcgttgaa gctttcggcc tggtaagct 7980  
 caactggatc aactgggtga ctcgggagat taggatcttt gattcccagt ctggcggcct 8040  
 tgaacagata gctgttcaga gcgacactta gggcaagtgc cacaacacc catttgaga 8100  
 ggacgggatc ttccaggctg gtgagcaggc taccgacct tttccacca actccatact 8160  
 cgtgtagctg cgaggtacca cggatgaatgg aaggatactc tagttcgtac ttgatggggg 8220  
 cgaggacagt gaccatagtc gattgaccgc gccctcttgc ctggaaaagt agttcatcta 8280  
 gtccacttcc agctacctg aagggtcaa gcgggggttt aatggccgat ccgctcagac 8340  
 tttcgggtcca agatgatata ctggacaacg atccactaga agaggcttgg aaaagggtgg 8400  
 agccgatgtt gacgaggttg acgataagga aaccaacgac catccagaat ttgaacttcg 8460  
 gaacactgct gcctttcata tcattgccaa acagatatgt acgtgcactg tcttgggcat 8520  
 cattgctggc cgcgacactc tccgccgtcc gctgactgag accctcatct tccaacgcgt 8580  
 accgcatgtt gatatgacgt ttgaggcggt ttacctgag cttgatagac agaatcgag 8640  
 tgtagaatgt aaacagcagc agacagtcaa agaacaggat caatgcagct agaacacaga 8700  
 agtgctgtag cccaccttgg atgcctaaga cagcaccgat aactaggagc aggatctcga 8760  
 ccacgtagtg gcacacgata ttgtaaccct tctcccgaat ggcgcttcgt acggcgtaat 8820  
 tgatggtact ttcagcaatg gctgtcacgc taccctggtc agactgtatc ttctggggct 8880  
 ttcggtgctg cacagcatag gacaaaacag ccctggtcag agtgatgctc ttctcaaagc 8940  
 caacgatcac caccaagaag gggaggcctt cggatagcaa cctcatgctc atcggaaccc 9000  
 ctagtcttat ggccacgtcg agaccgagga gaaaggcaaa tgttgacgac aaaaggacgc 9060  
 ttgtagccag ccaaaccctc gatcccaatt tttcatgct gaggaagagt gagacgaaag 9120

tcaagtgc at tgatatataa cctagcacca tgacaaccac gtcgagcggtt tgagcgctct 9180  
 tgataagatc aagagactct gtccaggtat cgtgcaccca ttgagcaagg ctgcgttttg 9240  
 tgtgagccct ggcagccttc atgatccaca tctggcggttc catctcgatc aattgcgtct 9300  
 cctgcaattt caggtcggca ctgttggttg ggatttcttg aacagcagcc acgagttccg 9360  
 gcgcgctgct gtattccaca gagaaggcga aaactttatc tttcgaatag gcggttaaag 9420  
 ggctcgacgt tgagggaagg tcaatcacag ataggttcac agggagggga gcaaggaatg 9480  
 gtgaggctgc ttgagatgca accccatatg accccgggaa taccaaggctc attagtgcctt 9540  
 gatggttgaa atctccgaga acatctgcat ccccgctgaa gctctgccac ttccagccat 9600  
 tctgtgggcc ggtgatcaag cttcgacttc cttcgaccaa agagccccat tctgctttat 9660  
 caacgtttgc ggggccatgg aagaagctgt ctttgagtag tccaacgtat gtggtactag 9720  
 ctagaatagc tatggtgcaa acggtatgga tcgggtgtag acacgccgtt ttgatagaa 9780  
 attggagtgt ggaggtcaat gcccgatttc ccgagcgtag aggggtgctgc tgattcattg 9840  
 attccctacc gcgaaagcga gagggtagca acgaagcgac catgctgaaa ggtctgtgct 9900  
 acagcttgga gtggtaccta tagctaggta gtctctgaga aaagaatcta gtcagctctg 9960  
 caaatgggga cggaagca cttcaattgg gaattagggc ttgagataaa gtgcatacct 10020  
 ccaaaatcga atgagcaacc taatcggtta ggcgccatagg tataatctgc cgtcgtagat 10080  
 tggaggaagg ttgttcggcc caaggggttg ggagggacaa ctgaacagtt cctaggtacg 10140  
 ggaaatgagt agaagaaaat aacaaatggc gcgcgcccct gaggctgagg cagcggaaag 10200  
 attcgcttcc ttatccctgc atctggtcca cctttatgaa tggattcatg accggtgtca 10260  
 actgctgcct aggggtataat tggttaagggg taccaagcaa aggatagtag gaccaattgc 10320  
 actgaaaact agtatttgtg ctcataacta tgctcagttt ccaaggtttt tatgcataaa 10380  
 tttatccttt attcgagaaa aaagaattct ggggacacca atcaattgcc ctgataccta 10440  
 ggaatgtgaa ctccaagat tgttcgaaa gtaggccaaa tgaccaataa gacagaacac 10500  
 tacctaggta tagttatttt gtcatgccta gatccgacat acaaaggagc gtcctcttac 10560  
 atagacgtcc tgtagacgt ttctaactctg actcgatttg tggtcctttt ttggtggggc 10620  
 ggcaagctgc atcgatcacg cccggacgag gccacttcgt gaggaatgga aatatattgt 10680  
 gcctacggag taatgcacca cgaaacacat tcttctcgaa acgactactt acgcagggat 10740  
 gtatgggtat tattctgtcc acgaaaagcc agtgtcaacc ccccccccc ccccccccc 10800  
 cggtatcatt tatctcagta aacagcaacc tgaacaagat acccaggtag acaagaagtc 10860

agtttggagt atagtgtata gactcgggaa catttttgtt ggacctccgt acgtgtctct 10920  
 caaatcggcg tctctcggtc tttggatacc ttcggagtta cacggggcct tgttgccaag 10980  
 gcttcaatat tcggcgcatg gattttcttt gtgcatgggt ctgagtgggg tgccgtaagg 11040  
 tatggtattg ctcccgattg ggagttctga cagatgatca tgccgccttc cgaagtagaa 11100  
 aaaagaggaa agggtcacat gctcatgatg atcgtttgct cgcgatgaat tgcgcttcct 11160  
 gcatatatatt tgtttgcttg tcttagtcaa ccgataatgc aaattttggg gatttgttat 11220  
 tgttggaat tgaattacca actgcttaca ggaccacccc tgcgctcagg ccctcaacaa 11280  
 accttgggac aggattaccc actaagcctt tccaagcttt tccaaggctt ttggattcgt 11340  
 ttggtttgat agctcgtatg cgtatttcgc atctgtgtac ggagtatcgg attctgacag 11400  
 cctccattat acccgaaaac tacctggccg gcctgacctg tttcgtcttg ttcgacgggt 11460  
 tcccatcggc gttttgactc gggattatcg tgacgacaga caatgcctcc cgaaccggta 11520  
 cctctaaggt attgccccga gcatagcatg gtggtccggg gtttcccatg ggcacagagc 11580  
 gaatatcgtg tcacgtccaa gatgaaaaca aaccccgaac tatgaatcac gtgtcggggg 11640  
 cagcttatgc atctatagct atgccaggga cctgtagact gttggaagac tatcaacgggt 11700  
 tttatcacca gggcgactga tataatcagtc aatgaaacaa cgttggaatg aacaataccc 11760  
 ccgccgtaac cgcaaccgca accgcaaccg caaccgcaac cgcaatggca ggctcggcct 11820  
 gctctaacac atccacgccc attgccatag ttggaatggg atgtcgattt gctggagatg 11880  
 caacgagtcc acagaagctt tgggaaatgg ttgaaagagg aggcagtgcc tgggtctaagg 11940  
 tccccctc gcgattcaat gtgagaggag tataccaccc gaatggcgaa agggtcgggt 12000  
 ccgtgagtat ctaacatgca tgcatttata tcttgttttg aatatttgac acaagatttg 12060  
 agcatcactg aagcttggtt actgactcca aggatgactg gatagaccca cgtaaagggt 12120  
 ggacacttca tcgacgagga tcctgcttta tttgacgccg cgttcttcaa catgaccaca 12180  
 gaggtcgcca gcgtatgatt atttcaattg atctaaccg ggacgcagag atctaattt 12240  
 ggacagtgca tggatccgca gtatcggcct atgcttgagg tggcttacga atcgctggag 12300  
 agtggtatgt agtgtgggtc atcctcactg taagcaaacg tcaatgacca tcatccagcc 12360  
 ggtatcacca tcgatggtat ggcaggctct aatacgtcgg tgtttggggg tgtcatgtac 12420  
 cacgactatc aggattcgtt caatcgtgac cccgagacag ttccgcgtta tttcataact 12480  
 ggcaactcag gaacaatgct ttcgaaccgg atatcacact tctacgactt acgtgggtccc 12540  
 agcgtgacgg ttgacacggc ctgttcgacg acattgaccg cactgcactt ggcgtgccag 12600



agcttacgta ctggggagtc agatacagcc atcgttatcg gtgcaaactct tctgctcaat 12660  
 cccgatgttt ttgttacgat gtcaaacctg gggtgagttt tccgaagaag attccagatc 12720  
 gagagtcttg aactaagcaa tccttggtgc tcaatgacag atttttgtcc ccggatggta 12780  
 tctcgacttc ttttgatcct cgagcgaatg gatatggctg cggggaagga attgccgctc 12840  
 tggtaataaa ggccctccct aacgcgttgc gagaccaaga ccctatccga gccgtcattc 12900  
 gagagacagc gctgaaccag gatggcaaaa caccgcgaat tactgcgccg agtgatgtgg 12960  
 cgcagaaaag tctgatccag gagtgttacg ataaggctgg gctagatatg tcgttgacct 13020  
 cgtacgtgga ggcccacgga actggaacac caactggtga ccccttgaa atctcagcaa 13080  
 tttcagcagc ttttaaagga catcctctgc accttggtc tgtgaaagca aatattggcc 13140  
 atacagaagc cgccagtggc ctggccagta taatcaagggt ggcccttgcc ttggagaagg 13200  
 gcttgattcc ccctaattcg cggttcctgc aaaagaacag caagctgatg cttgaccaa 13260  
 agaacatcaa ggtaaggctt tgcgcattcg cagattcagt tatatgtttc aaaggttaat 13320  
 gtttcaaaga tcccatgtc tgctcaagac tggcctgtga aagatgggac tcgtcgcga 13380  
 tctgtcaata acttcggctt tgggtggttcg aatgctcacg tcattttgga atcatatgat 13440  
 cgcgcatcat tggccctgcc agaggatcaa gtgcatgtca atggtaactc tgagcatggt 13500  
 agggttgagg atggttccaa acagagccgc atatacgttg tgcgtgccaa ggacgagcaa 13560  
 gcttgtcggc gaacgatagc aagcctgcga gactacatta aatccgtcgc tgacattgac 13620  
 ggggaaccct tcctcgccag cctcgcctat acactaggct ctcgccgttc cattctgcca 13680  
 tggacgtcag tgtatgtagc agacagcctt ggcggccttg tttctgccct cagcgatgag 13740  
 tccaatcaac caaaacgagc gaatgagaaa gtacggctcg gatttgtatt caccggtcag 13800  
 ggggcgcagt ggcatgcaat gggcagagag ctggtcaata cattcccagt attcaaacag 13860  
 gcgattcttg aatgtgatgg ctacatcaag caactgggcg cgagttggaa ttttatgggt 13920  
 aagttgcgag cccgggaaaa gtaatactgt atcaagcttg aggtactaac attcaattgc 13980  
 acagaggagc tccaccgtga tgagctgacg actcgggtaa atgatgccga atacagtcta 14040  
 ccactgtcaa ccgctatcca aattgcactt gtgcgtctcc tttggtcatg gggaattcgg 14100  
 ccaacgggga taaccagtca ctcaagtgga gaggtgctg ctgcctacgc agctggggct 14160  
 ttatccgcgc ggtcggccat tgggatcact tatatacgcg gtgtattgac cactaagccc 14220  
 aagcccgcat tggcagccaa aggaggaatg atggcggtgg gtcttggtcg cagtgagacc 14280  
 aatgtttaca tttcgcgtct caaccaggag gacggctgtg tgggtggttg atgtatcaac 14340

agtcaatgta gtgtgacggt gtcgggagat ttgggtgcaa tcgagaaact tgaaaagtgtg 14400  
 ttacacgccg atggcatctt taccaggaaa ctgaaagtca ctgaagcctt ccattcaagc 14460  
 cacatgcgac caatggcaga tgcctttggg gcgtcactga gagatctgtt caactcggat 14520  
 aacaacaacg acaatcccaa tgctgacacc tcaaagggtg tattatattc atcacctaag 14580  
 actggtagtc gcatgaccga tcttaaattg ctattggatc ccacacactg gatggatagt 14640  
 atgctacagc cggtagagtt cgagtcctca ctccgcgaga tgtgctttga tcccaacacc 14700  
 aaagagaaaag ccgtcgatgt gattattgaa atagggcctc acggagcgct tgggtggtcca 14760  
 atcaaccaag tcatgcagga tctgggtctg aaaggaacag atataaacta tctcagttgc 14820  
 ctttctcgcg gcagaagctc gttggagaca atgtatcgtg ctgctacgga gttgataagc 14880  
 aagggttatg ggctcaaaat ggacgctata aactttcctc atggaagaaa agagcccaga 14940  
 gtgaaggtag tgagcgattt gccggcgtag ccgtggaatc accaaacccg ttattggaga 15000  
 gagcctcgcg gcagtcgtga gtccaaacag agaaccatc cgcctcacac tttgataggc 15060  
 tcacgggaat ctctctctcc tcatttcgcg cctaaatgga aacatgttct ccgtctgtca 15120  
 gatattccat ggatacgaga tcacgtcggt gggtcgagca tcacttttcc gggagctggc 15180  
 ttcatcagca tggccatcga ggggttttca caagtctgcc caccagttgc gggggctagc 15240  
 atcaactaca acttgctga cgttgaactc gcgcaggctc tcataatacc cgctgatgca 15300  
 gaagcagagg ttgacctgcg cctaacgac cggtcatgtg aggaaaggc cctcggcaca 15360  
 aagaactggc atcaattttc tgtgcactca atttcgggcg aaaataatac ctggacagaa 15420  
 cactgcaccg gattaatacg ttcggagagc gaaagaagcc accttgactg ttcaactgtg 15480  
 gaagcctcac gcaggttgaa tctaggctca gataaccgga gcattgatcc caacgatctc 15540  
 tgggagtcct tacacgcgaa tgggatatgc cacggacca tttttcagaa cattcagcga 15600  
 attcaaaaaca atggacaggg ctcgttttgc agattttcca ttgctgacac tgcctcggct 15660  
 atgcctcact cgtacgagaa tcgacacatc gtccatccta ctactctgga ctcggtgatc 15720  
 caggcggcat acacggtgtt accctacgcg ggaacacgta tgaaaacggc catggtacca 15780  
 aggaggctaa gaaatgtcaa aatatcctct agcctggctg acttggaggc tggatgatgct 15840  
 ctggacgcac aggccagcat caaggatcgc aactctcaat ctttctctac cgacttggca 15900  
 gtgtttgatg actatgatag cggttcttct ccctcggacg gaatcccagt catagagatt 15960  
 gaaggccttg ttttccagtc ggttggaagc agcttctctg accaaaagtc agactccaac 16020  
 gacacagaaa atgcctgcag ctcttggtt tgggccctg acatcagctt gggtgactcc 16080

acttggtca aagaaaagtt gagcactgag gctgagacga aagaaacgga actcatgatg 16140  
 gacctccgaa gatgcacgat caactttata caggaggctg tcaactgattt gacaaattct 16200  
 gatataccaa atctggatgg ccaccttcag aagtatttcg attggatgaa tgtccaattg 16260  
 gaccttgca gacaaaacaa gctcagccca gccagttgag actggctaag tgacgatgct 16320  
 gagcagaaga aatgcctaca ggccagagtc gctggagaaa gcgtcaatgg cgagatgatt 16380  
 tctcgtctag gacctcagtt aatagcaatg ctacgccgag aaacagagcc acttgagttg 16440  
 atgatgcaag atcagctgct aagcagatac tacgtcaacg caatcaaattg gagccgatca 16500  
 aacgcacaag ccagcgagct gatccgactt tgcgccaca agaaccgcg ttctcgcatt 16560  
 ttggagattg gcggaggcac gggcggctgc acaaagctta ttgtcaatgc attgggaaac 16620  
 accaagccga tcgatcgta tgacttcacc gatgtgtctg ccgggttttt cgagtcggcg 16680  
 cgtgagcaat ttgcggattg gcaagacgtg atgactttca aaaaattgga tattgaaagc 16740  
 gatcccgagc aacaagggtt tgaatgtgcc acctacgatg tggtcgtggc ttgccaggtc 16800  
 ctgcatgcaa ctcgatgcat gaaacgaaca ctgagtaacg ttcgaaaatt gctcaagcct 16860  
 gggggcaact tgattttggt tgagactacc agggatcagc tcgatttggt cttaccttc 16920  
 ggactgttgc caggttggtg gctcagtgag gagcctgagc ggaagtcgac gccatcgctc 16980  
 actaccgatc tttggaacac catgttggac acgagcggtt tcaacggtgt ggaattggag 17040  
 gttcgtgatt gtgaagacga tgagttttac atgatcagca caatgctatc gacggctaga 17100  
 aaagagaata caaccccgga tacagtggca gaatcggagg tgcttttgct gcacggagcg 17160  
 ctccgacctc ctcatcttg gctggaaagt ctccaggcag caatttgtga aaagaccagt 17220  
 tctagcccat cgatcaacgc tctgggcgag gtagatacca ctggaaggac atgcattttt 17280  
 cttggggaaa tggagtcctc gctccttgga gaggtgggaa gcgagacctt caaatccatc 17340  
 accgcgatgc tgaataactg caacgcactt ctctgggtgt ctagaggagc agccatgagc 17400  
 tccgaggatc catggaaagc tctacatatt ggtctgctgc gtaccatccg caacgaaaat 17460  
 aacgggaagg aatatgtatc gttggatctc gatccttctc gaaacgcata caccacgag 17520  
 tccctgtatg ctatctgcaa tatcttcaat ggccgcctcg gcgaccttc cgaagacaag 17580  
 gagtttgaat ttgcagagag aaacggcgtc atccacgtac cgcgactttt caatgaccg 17640  
 cactggaagg accaagaagc ggttgaggtc aactgcagc cgttcgagca acccgggcgt 17700  
 cgtctgcgga tggaggttga gacgccaggg ctcttagact ccctgcaatt tcgagacgac 17760  
 gaaggacgtg aaggcaagga tcttccgat gattgggtag aaatcgaacc caaagctttc 17820

ggtctcaatt ttcgggatgt catggttgcc atgggtcaat tggaggccaa ccgtgtgatg 17880  
 ggcttcgaat gcgccggagt gatcacaaag ctcggtggag ctgctgccgc tagccaaggc 17940  
 ctcagattag gggaccgcgt atgtgcacta ctgaaaggcc attgggcgac cagaacacag 18000  
 acgccgtaca ctaatgtcgt ccgtattccg gacgaaatgg gcttcccaga agccgcttcg 18060  
 gtccccctgg ctttacttac cgcatatatt gcgctttata ccacggcaaa gctacgacga 18120  
 ggcgaaagag tcttgatcca cagtggagct ggaggcgctg gtcaagcagc gatcattttg 18180  
 tcccagcttg cgggtgccga ggtcttcgtc acagcgggaa ctcaagccaa gcgtgacttt 18240  
 gtcggcgata aattcggcat caatccggat catatcttct cgagcaggaa tgacttattc 18300  
 gtcgacggca tcaaagccta cacgggcgga cttggcgctt atgtcgttct aaactcattg 18360  
 gcaggtaaac tcctccaagc aagctttgac tgcattggccg aattcggcag atttggttag 18420  
 attggaaaaa aggacctgga gcaaaacagc agacttgaca tgctgccatt caccggggac 18480  
 gtctctttca catcaattga tcttctctcg tggcaaagag ccaaaagtga agaagtatcc 18540  
 gaagcggtga accatgtcac aaaactcctc gagacaaaag cgattggctt gattggtcca 18600  
 atccagcagc actccttgct aaacatcgag aaggccttcc gtacgatgca gattggtcag 18660  
 catgttggca aagttgtggt caatgtatct ggggacgaac tgggtcccagt cggcgatgga 18720  
 gggttctcgc tgaagctgaa gcctgacagt tcttacctag ttgctggtgg gctgggggga 18780  
 attggaaagc agatctgtca gtggcttggt gatcatggcg cgaagcactt gattatccta 18840  
 tcgagaagtg caaaggccag tccattcata accagcttgc aaaatcaaca gtgcgctgtc 18900  
 tatctacacg catgtgacat ctcagatcaa gatcaggta ccaagggtgct ccggttgtgc 18960  
 gaagaagcac atgcaccgcc aattcgaggt atcatacaag gtgccatggt tctcaaggac 19020  
 gcgcttctat cgcgatgac attggatgaa ttaaatgcag caacacgccc aaaagtacag 19080  
 ggtagttggt atcttcacaa gatcgcacag gatgttgact tcttcgtgat gctctcatcc 19140  
 cttgttgggg tcatgggtgg ggcaggccag gccaattacg cagctgctgg tgcattccag 19200  
 gacgcacttg cgcaccaccg gagagcccat ggcatgccgg ctgtcaccat tgacttgggc 19260  
 atgggtcaagt ctgttgata cgtggctgaa actggccgtg gtgtggccga ccggctcgct 19320  
 agaatagggt acaagcctat gcatgaaaag gacgtcatgg atgtgttgga gaaggcaatc 19380  
 ctgtgttctt cccctcaatt tccatcacct cccgcagctg tggttacagg aatcaacaca 19440  
 tccccgggtg ctactggac cgaggcaaac tggatacagg aacagcggtt tgtgggactt 19500  
 aaataccgcc aagtccttca tgcagaccaa tcctttgtct cttcgcataa aaaaggacca 19560

gatggcgtgc gggcccaact aagcagggtc acctctcacg acgaggccat ttctatcgtc 19620  
ctcaaagcaa tgacggaaaa gctgatgcga atgtttggtc tggcagaaga cgacatgtcc 19680  
tcgtccaaaa acctggcagg tctcggcgta gactcactcg tcgccattga acttcgaaac 19740  
tggatcacat ctgaaatcca tgttgatgtg tcgatctttg agctcatgaa tggtaacacc 19800  
atcgccggcc tcgtcgagtt agttgtggcg aaatgcagtt aagttgaagg gttcagtga 19860  
gccttttgtc tggccaagcg ggtatagctc gacggaggta tagtacgaag gagcatagcg 19920  
gccatggtct gaagcctgaa tccaatctga atcgagcctg ggctgagcct gactatttaa 19980  
tgccctgactt ctggatagca gtaaatagag atacctgaaa taccattaca gtggccctga 20040  
gaagcaacaa agtacacatg tgcactcggt ctcgaagtcg gaagagtga tgccttttat 20100  
actaccaggg aagctgtctt agcacctcgg aggcttgact gtcaaaagtt ctctcttttt 20160  
ctctccatta tgattcccgc aagccttgta aatgcgcgtt gaacggtcga aaggcgttgg 20220  
cacgggcagt gggtacagat tgtggatatg tagtcggaag gcgggaggga gtacttgtgt. 20280  
ccacgtcggt gcgccgtcct ctctttcgcc tagtcgggga tgttgagtag gaacatcaag 20340  
acttaacaga gcctaagccc tcgtcatcgt aagcgccagt caacgcctga gagaatgggg 20400  
agatcgggtga ttgtaccggg agaaaagctt cattactgcc gacttcccta cgtggcgggtg 20460  
tagctggcgg tatagaagca gatggccgct ctgcgtagca ggaatacaca ctctctccct 20520  
tctctctctc tgtgtttctg tctctcgac atagccaaag tctacaccac gttcgattac 20580  
aaagaaggca tcacaatcga ataaaatgcg tttatttta ctaacctact cgactaatac 20640  
agcacctagt ttctctggga cggaaactat tggaataagc ctggggacgg atgcatattt 20700  
gttttagttt gcgtgttata tcttagcacc ggtcatgagg gagcgggatg tcctcgttgc 20760  
gccggcgtag catgagcttt gtggttgat gcatacgaac gctaaaagcg tgacggtagt 20820  
atttgtcatc gtctcctggt acaggcttca catcacttg aatcagtata tgagcgagga 20880  
gaatcttgat ttcttctgag gcgaagaacc gcccgggaca agcgcgtggg ttccagccga 20940  
agccgatgtg atcacgttg gtattctcca attgagcgtt gaaggccttg tctggatcct 21000  
cgcgcatgcg cataaatcgg tagggatcat aattttcggg gttttccac acatcagggt 21060  
tgttcatgcg gtctgcagcc acagcgcca actcgccctt gggaatgaag aggccattgg 21120  
atagagtgat gtctctgaga gcggtactgc gcatagtggc gcactcgacc ggcttgattc 21180  
gctgcgtctc ttcatgcag ctgtcgagga gcttcagctt gaacagagag gcaggcgtcc 21240  
agcccccttc tccgattaca gtgcggtctt cttggcggag aggctgaata aggtctgggt 21300

gcctggcaat gtccacaagg gcaccgacga aaagatccgt cgaggcgtag atgccggcga 21360  
 aatccatagc gagctgagca cccgccacat cgtaccagcg gccgtcggcg gtgtcttcaa 21420  
 accattgcat ggtatcgacg tactggggcg gctgcacgcc cttcgctaca catgcggcct 21480  
 tticagcacg tcgtcgtga atctcaggat caatgatctt tcgtgcgcgg cgcacttggg 21540  
 cagcaattt gcgtccttgc ggttgaaacc agtgagcgag cggtcgcagt agcatgggcc 21600  
 atacgcgaag ttggcgagct tgtaccgcca cactcacggc atggttcttt gcaatatcca 21660  
 gccactcctc attgtggcag attttgtcgc cgaccataat gagtgtgact gttcgtgtga 21720  
 caaggtccaa tccattggaa tagacagggt cggtttgcc ctttagtata ttcgcggtat 21780  
 gtcagccaga ggctcaatgc tcaagacaga aaaattgaca cttaccctcg cttttaccga 21840  
 acaacttggc aatagtagcg tcggccaagg tagccaatgg ctttgtgtac ttgggggctt 21900  
 gggtttgtaa ctggttcaaa acaactttgt tgacaagatg tgcattcctg cagatttcct 21960  
 tgaaccgcgc gaatccaggg agatgagagt gaaagtccta tacattcatc agaattctag 22020  
 agacgtcatt gagttacaac aatggaaaat tcagagggtca tacatccgcc aaaaacttgt 22080  
 acatgcacat atctttgatt ttccgaaact cgtcggccat ggacgatggg aggatgggtgc 22140  
 aatagccgga atcaacaatg aagcgcaggg gcttgctggt tttcgagaac caagcttcga 22200  
 tccagctcgg accatacgta tcgaagtcct gcctagccct catggtcgtc aactcccacc 22260  
 attttttggg attatagact tgcagttcgg actggcgccc ccgcaaacgg taggcgatga 22320  
 gactaagaag cactgcgacc gccacaaggg cttgaggggt cgatacccat tggtagcatt 22380  
 cgacggtcag aagaacctgg ccgagcattg cgtgagacag ataggacctg tgcacaccag 22440  
 tggaaaagaa gaaagagcga agaattgagag cgctgcgacg gtttataatc gaataacagc 22500  
 actaatgctt ctgggatttt gtggccgaga gcactcttcc agtcaacctt gaaaaaaaaa 22560  
 aaaccccccc cccaatcgaa gtttacctgg atggggcagt tcggttggtt ctttaggag 22620  
 cagcttcacc gagcagcaca agaacaatcc gagtgaaaaa ctcggtttca cttgataca 22680  
 gccaatgat attcacgttt gattcattca gcctcgtgtg accgaataac gccgtatgga 22740  
 ggaatggcta ttcgtgcacc gaatgacgcc gggagggttt gctaggtgcc gagcttgcatt 22800  
 tgctgggaag tgggggcatt tgagtactag aatggatctt gaaattgtcc gaatctagat 22860  
 gagtactgat acgtgcaagt aaatataacg acggtatcgg ttgcaaggcc ggcttgttcg 22920  
 ctcagagatt caactctgcg attctgtaag aacaaatgtt gtgcccggca tgcagtgaga 22980  
 agatctactg acgcaagaca aggtttaatc ccaatcctat cgcccaaaaa caggatcagc 23040

agttatggat caagccaact atccaaacga gccaatgtg gtagtgggaa gcggttgtcg 23100  
 gtttccaggt ggtgtcaaca caccatcaaa actttgggag ctgctcaaag agccccggga 23160  
 tgtacagacc aagatcccta aggagagatt tgacgtcgat acatittaca gccccgatgg 23220  
 cactcacccc gggcgcacga acgcaccctt tgcatacttg ctgcaggagg atctacgcgg 23280  
 ttttgatgcc tctttcttca acatccaagc tggagaggcc gaaacgattg acccacagca 23340  
 aaggctgctg ctggagacgg tctatgaagc tgtatccaac gcaggcctac ggatccaagg 23400  
 ccttcaagga tcctctactg ctgtgtacgt cggtatgatg acgcatgact atgagactat 23460  
 cgtgacgcgt gaattggata gtattcctac atactctgcc acgggggtag ctgtcagtgt 23520  
 ggcctccaac cgtgtatcat acttcttcca ctggcatggg ccgagtgtga gtgccactca 23580  
 ttgagcgagc ccgacttcgt caagtgtga cagattcctg actgattctg cagatgacga 23640  
 tcgacacagc ctgtagttca tccttagctg ccgtgcatct ggccgtccaa cagcttagaa 23700  
 cgggcgagag taccatggcg gttgcagccg gtgcgaatct gatattgggc cccatgacct 23760  
 ttgtaatgga gagcaaattg aacatgctgt cccccaatgg tagatctcga atgtgggatg 23820  
 ctgctgccga tggatatgcc agaggagtaa gttgacaatg catcaattcc tttcaaaaaa 23880  
 agcaagatgg cactgacctc ctgtaactgc tttttaggaa ggtgtttgct ctattgtcct 23940  
 gaaaacgctg agccaggcac tgcgcgacgg ggacagtatc gagtgtgtta tccgagagac 24000  
 cggatatcaac caagatggcc gaacgacagg tatcacaatg ccaaaccata gcgcacaaga 24060  
 agccctcatt cgggccacat atgccaaggc tggctttgat attaccaacc cccaggaacg 24120  
 ctgccagttc tttgaagccc atggtaagtg gtattccctg gaagtatcag ccttatggaa 24180  
 gttgcagaaa gtctctctct ccctaacacg aagatcccag gaactggtac accagccggt 24240  
 gaccacaggg aagctgaggc tattgcaaca gccttcttcg gacacaagga tggaacaatc 24300  
 gacagcgacg gcgagaaaga tgagcttttt gtcggcagca tcaagacagt tctcggtcac 24360  
 acggaaggca ctgctggtat tgcgggctta atgaaggcat cgtttgctgt acgaaatggc 24420  
 gtgatcccg ccaaactgct gtttgagaag atcagtcccc gtgtcgctcc gttctatacg 24480  
 cacttgaaaa ttgcaacgga ggccacagaa tggccgattg ttgcgcccgg gcagcctcgc 24540  
 agagtcagcg ttaattcatt tggtaaggat tcaactgcac ttcttgagaa cgaaagtga 24600  
 gttagctaaa catataaaca catcaggatt tggtggtaca aatgcccatg ctattatcga 24660  
 agagtatatg gctcctccac acaagccgac agcagtggta acagaggtga cctcagatgc 24720  
 agatgcatgc agcttgcccc ttgtgctttc atcgaagtcg cagcgctcca tgaaggcaac 24780

gctagaaaat atgctccaat ttctggaaac gcatgatgac gtggacatgc atgatatcgc 24840  
 atatacctta cttgagaaac ggtctatctt gcccttccgt cgtgcgattg cagcacacaa 24900  
 caaggaagta gcccgcgcgg cactggaggc tgccatcgcg gacggtgagg tcgtcaccga 24960  
 cttccgcacc gacgcgaatg acaaccctcg cgtactaggt gtctttactg gccaaagtgc 25020  
 acagtggccg ggcatgctga agaagctcat ggtgggtatg ccatttgtga gaggcattct 25080  
 cgaagagctg gataattcac tgcaaacact gcctgaaaag tatcggccta cgtggacact 25140  
 gtatgaccag ctcatgcttg aaggggatgc ctcaaacgtc agactcgcca gcttctccca 25200  
 gcctctatgc tgcgccgtac aaatcgttct ggtccgactt ctgctgcag ctggtatcga 25260  
 gttcagtga attgtcggcc acagttcagg tgagattgcc tgtgcctttg cggcaggatt 25320  
 catcagtgcc actcaagcta tccgtattgc gcatctgcgt ggagtttgtt ccgcggagca 25380  
 tgccctcttct ccaagcggcc agacaggcgc tatgctagcg gcaggtatgt cgtacgatga 25440  
 cgcaaaggaa ctatgcgagc tcgaagcctt tgagggtcgg gtctgcgtcg ccgctagcaa 25500  
 ttcaccggat agtgtgacct tctccggcga catggatgct atccagcacg ttgaaggtgt 25560  
 cttggaggat gaatccactt ttgccagaat cttgagagtt gacaaggcct accattcgca 25620  
 tcacatgcac ccatgcgcag ctccatatgt caaggcattg ctggagtgcg actgtgctgt 25680  
 tgccgatggc caaggtaacg atagtgttgc ttggttctct gccgtccacg agaccagcaa 25740  
 gcaaatgact gtacaggatg tgatgcccgc ttattggaaa gacaatctcg tctctccggt 25800  
 cttgttctcg caggctgtgc agaaagcagt catcactcat cgtctaactg acgtcgccat 25860  
 cgaaattggc gccaccctg ctctcaaggg tccgtgtcta gccaccatca aggatgctct 25920  
 tgccggtgtg gagctgccgt ataccgggtg cttggcacga aacgttgacg atgtggacgc 25980  
 ttttgctgga ggtctgggat acatttgga gcgtttcgga gttcggagta tcgacccga 26040  
 gggcttcgta caacaagtcc ggcccgatcg tgccgttcaa aacctgtcaa agtcattgcc 26100  
 cacatactct tgggatcata ctgctcaata ctgggcagaa tctcgctcca cccgccagca 26160  
 tcttcgtgga ggtgcgcccc atcttctgct tggaaagctt tcttcttaca gcacagcatc 26220  
 gaccttccag tggacaaact tcatcaggcc ccgggatctg gaatggctcg acggtcatgc 26280  
 gctacaaggc cagactgtgt tccccgctgc tgggtacata attatggcca tggaaagtgc 26340  
 catgaagggtg gctggtgagc gtgccgcca agttcagctc ctggaaatct tggacatgag 26400  
 catcaacaaa gccatcgtgt ttgaagatga aaacacctcc gtggagctga acttgacagc 26460  
 cgaagtcacc agtgacaatg atgcggatgg ccaagtcacg gtcaaatttg ttattgattc 26520



ctgtctggca aaggagagt agctttcgac atccgcaaaa ggccaaatcg tcataaccct 26580  
 tggcgaggca tcaccgtcat cgcagctttt gccgccacct gaggaagagt acccccagat 26640  
 gaacaatgtc aacatcgatt tcttctatcg ggaacttgac ctctttgggt atgactacag 26700  
 caaagacttc cgtcgtttgc agaccatgag aaggggccgac tccaaagcta gcggcacctt 26760  
 ggcttttcctt ccacttaagg atgaattgcg caatgagccc ctcttgctcc acccagcgcc 26820  
 cctggacatc gcgttccaga ctgtcattgg agcgtattcc tctccaggag atcgtcgcct 26880  
 acgtcattg tacgtgccta ctacgttga cagagtact ctgattccat cgctctgtat 26940  
 atcggcgggt aattctggtg aaaccgagct tgcgtttgac acaatcaaca cacacgacaa 27000  
 ggggtgatttc ctgagcggcg acatcacggt gtacgattcg accaagacaa cgcttttcca 27060  
 agttgataac attgtcttta agcctttctc tccccgact gcttcgaccg accaccgaat 27120  
 ctctgcaaag tgggtctggg gacccctcac gcccgaaaaa ctgctggagg accctgcgac 27180  
 gttgatcata gctcgggaca aggaggacat tctgaccatc gagcgaatcg tttacttcta 27240  
 catcaaatec ttcctagccc agataacccc cgacgaccgt caaatgccg acctccattc 27300  
 ccagaagtac attgaatggt gtgaccaggt tcaggccgat gctcgggctg gccaccatca 27360  
 gtggtaccag gagtcttggg aggaggacac ttctgttcac attgagcaaa tgtgtgaaag 27420  
 gtacacccaa agctgttccg tgttttttca ttcttttata ttaacctttt acttgaagca 27480  
 actcgtccca cccacatgtg cgcctgatcc aaagggtagg caaagaatta attcaattg 27540  
 ttcgcgggaa cggggatcct ttggatatca tgaaccgcga tgggttggtc accgagtact 27600  
 ataccaaaa gctcgccttt ggctcagcaa tacacgtcgt tcaggatctg gttagccaaa 27660  
 ttgctcatcg ctaccaatcc attgatatcc ttgagatcgg taagtcgaat ctgaaatgta 27720  
 agtaactagg cagtttgcta atctgtcgtt cgcttttttag gcttgggtac aggcacgcgc 27780  
 acgaagcgcg ttcttgcatc acctcaactt gggttcaaca gttacacttg cactgacatc 27840  
 tcggcgggatg ttattggcaa ggcccgtaga caactttccg aattcgacgg tctcatgcag 27900  
 tttgaggcac tagacatcaa cagaagccca gcagagcaag gattcaagcc tcactcctac 27960  
 gatctgatta ttgcatccga tgctctccat gccagctcca acttcgagga aaaattggct 28020  
 cacataaggt ccttgctcaa gccgggtggt cacttggtta ctttcgggggt caccatcgc 28080  
 gagcctgctc gcctcgctt catctctggg cttttcgctg atcgatggac tggagaagac 28140  
 gaaactcgtg ctttgagtgc ctcggggtcc gttgaccaat gggagcatac cctcaagaga 28200  
 gttgggttct ctggcgtcga tagtcggaca cttgatcgag aggatgattt gatcccgtct 28260

gtcttcagta cacatgctgt ggatgccacc gttgagcgtt tgtatgatcc actttctgct 28320  
 ccattgaagg actcataccc gccattagt gttatcgggtg gcgaatcgac aaaaaccgaa 28380  
 cgcattttga acgacatgaa agctgcccta ccgcatagac acatccactc cgtcaagcgg 28440  
 ctggaaagtg ttctcgacga cccggccttg cagcctaagt cgacttttgt catcctctcg 28500  
 gaacttgatg atgaagtgtt ttgcaacctt gaagaggaca agtttgaggc agtcaagtct 28560  
 cttctcttct acgccggacg catgatgttg ctgacagaga atgcctggat tgatcatccc 28620  
 caccaggcca gcaccatcgg aatgttgagg acaatcaagc tcgagaacct tgacttggga 28680  
 acgcacgtct tcgatgtcga tactgtggag aacctagaca ccaaattctt cgttgagcaa 28740  
 cttttgcgct tcgaggagag cgatgatcag cttttggaat caataacatg gactcatgag 28800  
 cccgaagtgt actggtgcaa gggtcgtgcc tgggtccctc gtttgaagca ggatattgct 28860  
 aggaacgacc gtatgaactc gtctcgtcgt ccaattttcg gtaactttaa ttcgtccaag 28920  
 acggccattg cactgaaaga ggcgagggga gcacccatcat cgatgtacta tcttgagtca 28980  
 accgagacgt gtgattcgtt agaagacgct cgatcatgctg gaaaagcaac tgttcgtgtt 29040  
 cgctacgctc ttccccaggc aattcgcgtg ggccatctcg gatacttcca tgtcgtgcag 29100  
 ggcagtattc tggagaatac atgtgagggtg cctgtagtcg ccctggctga gaagaatgga 29160  
 tctatactgc atgtaccgag aaactacatg catagtctgc ccgataacat ggcggaaggc 29220  
 gaggatagtt cttcttgtt gtccacagct gcagccctcc ttgccgaaac aattctctct 29280  
 agcgctcagt ctttggctc tgatgcatca attctgatta tggagcccc aatcttctgc 29340  
 gtcaaagcaa ttctggagtc ggccaaaacc tacggtgttc aggttcattt ggcaacaact 29400  
 ctgtccgacg tcaaaactat tccggctcct tggatccgat tacatgccaa ggaaaccgac 29460  
 gctcggctga aacacagcct gccgacaaac atgatggcat tctttgactt gtctaccgac 29520  
 cggactgctg ccgggataac caaccgtttg gccaaagtgc taccaccag ttgcttcatg 29580  
 tacagtgggtg actatcttat ccgaagtaca gcttccacat acaaagttag tcatgttgag 29640  
 gatattccaa tcctcgagca ctctgtggca atggcaaaaa ataccgtctc tgcgtcgact 29700  
 gtcgacgaca ctgagaaagt tattacagcc acacaaattc tcttgccctgg tcagctctct 29760  
 gtcaaccaca atgaccaacg cttcaatctg gccaccgtca tcgactggaa ggaaaatgag 29820  
 gtgtccgcta ggatttggcc catcgactct ggtaacttat tttccaacaa gaagacgtat 29880  
 ttgcttgttg gtcttaccgg ggaccttggc cgctctctct gtcgctggat gatcttgcac 29940  
 ggcgcccgcc atgttgtgt cactagccgg aaccctcgac ttgatcccaa atggatcgcc 30000

aacatggagg cacttggtgg tgacatcacc gttctgtcaa tgtaagttga ttgatatcac 30060  
 atcacacctt gctaccacat cctcgtttac ttatccaatt actttcttta gggatgttgc 30120  
 caatgaggat tcagtcgatg ctggccttgg caagcttgtc gatatgaagt tgccacctgt 30180  
 tgccggcatc gcgttcgggc ctttggtgct gcaggatgtc atgctgaaga acatggacca 30240  
 ccagatgatg gacatggtgt tgaagcccaa ggtacaagga gcacgcattc ttcatgaacg 30300  
 gttctccgaa cagacgggca gcaaggcgct cgacttcttc atcatgtttt cgtccattgt 30360  
 tgcagttatt ggcaatcctg gccagtccaa ctatggcgct gcgaatgcct acctacaggc 30420  
 tctggcccag caacggtgcg ccagaggatt ggcggtatit tctaccctg aattatcatg 30480  
 catcgacgtc aagttactaa cgcacaacca cagggatcaa ccatcgatat tggtgccgtt 30540  
 tacggtgtag ggtttgtcac gagggccgag atggaggagg actttgatgc tatccgtttc 30600  
 atgtttgact cagttgaaga gcatgagctg cacacgcttt tcgccgaagc ggtcgtgtct 30660  
 gaccagcgtg cccggcagca accacagcgc aagacgggtca ttgacatggc ggaccttgag 30720  
 cttaccacgg gtatcccaga tcttgaccct gcgcttcaag atcgaattat ttacttcaac 30780  
 gaccctcggt tcggaaactt caaaattccc ggtcaacgcg gagacgggtg cgacaatgga 30840  
 tcagggtcta aaggctccat tgccgaccag ctcaaacaag caacaacttt agaccaagtt 30900  
 cggcaaatcg tgattggtaa gttatctctc atgcgtttcc tgatatcgag ttcaaactaa 30960  
 caaagttgca gatggtctat ctgagaaact ccgtgttacc ctccaagttt cggacgggga 31020  
 gagcgtggac ccaaccattc ctctcattga tcaagggtgc gactccttgg gtgcagtgc 31080  
 tgtcggctca tggttctcaa agcaactcta ccttgacctc ccactcttga gggacttgg 31140  
 cgggtgcttct gtcgctgac ttgccgacga cgcgccacc cgactccag ctacatccat 31200  
 tccgctgctg ttgcaaattg gtgattccac gggaacctcg gacagcgggg cttctccgac 31260  
 accaacagac agccatgatg aagcaagctc tgctaccagc acagatgcgt cgtcagccga 31320  
 agaggatgaa gagcaagagg acgataatga gcaggaggc cgtaagattc ttcgtcgcga 31380  
 gaggttgctc cttggccagg agtattcctg gaggcagcaa caaatggtaa aagatcatac 31440  
 catcttcaac aacactattg gcatgttcat gaagggtacc attgacctcg accggttgag 31500  
 gcgggctctg aaagcctcat tgcgccgtca cgagatcttc cgtacgtgct ttgttactgg 31560  
 cgatgactat agcagcgatt taaatggctc cgtccaagtg gttctcaaga acccggagaa 31620  
 cagagtgcac tttgttcagg tgaacaacgc tgcggaggca gaggaagagt accggaaact 31680  
 cgagaagaca aactatagca tctccacagg tgacactctc agactcgttg atttctactg 31740

gggcacagat gaccacctgt tggtaatcgg ctaccacaga ttagttgggtg atggctcaac 31800  
 aacagaaaac ctgttcaatg agatcgggca gatttacagc ggggtgaaaa tgcagcgacc 31860  
 atcgacccaa ttctctgac tagccgtcca acagcgggaa aacctggaaa atgggcgaat 31920  
 gggggacgat atcgcgttct ggaagtccat gcatagcaaa gtctcgtcat ctgcgccaac 31980  
 cgtgcttccc atcatgaatc tgatcaatga ccctgctgcc aattcagagc agcagcaaat 32040  
 acagccattc acgtggcagc agtatgaagc aattgctcgt ttagatccca tggtcgcctt 32100  
 ccgaatcaaa gagcggagcc gcaagcacia ggcaaccccc atgcagttct acctggccgc 32160  
 ctaccacgtt ttgttgccgc gtcttaccgg cagcaaagac ataaccatcg gcctcgccga 32220  
 aaccaaccga tccaccatgg aagaaatttc ggcgatgggc tttttcgcta acgtgcttcc 32280  
 cctgcgcitt gatgagttcg tcggcagcaa gacattcggc gagcaccttg tagccaccaa 32340  
 ggacagtgtg cgtgaggcca tgcaacacgc gcgggtgccg tatggcgtca tctcgcactg 32400  
 tctaggcctg aatctcccta cctcaggcga ggaacccaag actcagacac acgccccctt 32460  
 gttccaggct gtctttgatt acaagcaggg tcaagcggag agtggctcaa ttggcaatgc 32520  
 caaatgacg agtgttctcg ctcccggtga gcgcactcct tatgacatcg ttctcgagat 32580  
 gtgggatgac cctaccaagg acccactcat tcatgtcaaa cttcagagct cgctgtatgg 32640  
 ccctgagcac gctcaggcct ttgtagacca cttttcttca atcctcacta tgttctcgat 32700  
 gaacccggct ctgaagtgg cctagatcgt tcagcgccgt gaattcagat gtgtggtttg 32760  
 agtgttggtc atgataaaga tggattagaa attggcaata gagcagatgg caaatctatc 32820  
 ctgaattcgg cgtcaattga cacacgcata ttcatctaca aatagcgaat tcgtcttgta 32880  
 tctttgtcaa aattacttct accttcgttg ctcttcttta ttgcagcaat cgtaacatca 32940  
 agttagatag cgcggttcag agtaccgtaa cggtgataaa tatacctcgg tagcgcgttt 33000  
 cgaaagactc tgtgaggaag gtgaaacctc caaggcttgg aattgatttc aatccatcct 33060  
 gtatatataat tcgacgcat tgcaaatagt tccatagtta ctggtttagt gccttgttgt 33120  
 ggtgatcgag tggttttaga tgtctgtcat gcctgttcag aacgagcctt ccatgatcta 33180  
 tccaaaatat gttcacgaaa tatttatgag atggtcgcga ccactataac taaatcacc 33240  
 ttggaagggtg agcattcaaa ccgtgtaaga ttagaactat tcaaatttgt tcagtaaaaa 33300  
 tgttggtatgg actaggcatg agagccagag ccttgctata taccctgttg tctcacctag 33360  
 acaaatgaac ctgacatctt gaccttttga tatagctgtt ggaagcgctt gaccgtctcc 33420  
 tggacatcac tcggtctgtt gggaaaatta tgctttccct gaaactcgag tacatctgca 33480

ttctgaggca ggtaatgtgt ttcaaccatc tgtctcgacc cttggagagc aaaatcttga 33540  
cgaccgtgaa gatgcagtgt cggcacgttg attattagct tgtcgtcgtc gtcttgcgcc 33600  
tcggctctca tgtaatctct ggcttcatcg ctatagaaac agcaaatcaa aacagcaatg 33660  
ctcattttcg gaaaccatgg cagttttccc atttgctgtt gatggagcag caaagtggcg 33720  
accaatgcgc cctcagagaa ggccactatg ccgacaatgg gtgcctgtgg gttagttata 33780  
gaccaatctt ggacgggtctt ttgcacaggc ccgatcacag ccgctactct atcgcccacc 33840  
gtgggggttg tcgtgtttgt aacggcgtca tgatgctttt ggaaccaggt gtagtatgga 33900  
cccatgcctt ggaagacagg aagcacgccg ggtccggggc tggagctaaa cggcgcggtc 33960  
gcatatacga attcaaactc gtttttcaac gccacgcgca gtttagagat ctggacgcgg 34020  
aatatggctg ctgagcaccg ggcaccgtgg atgcataaga gagcttttct cggtttgcct 34080  
ggcgagaaat ctgtaatcct cgctggactc attttctctt gtggtgtgag ctgtgacttc 34140  
gtctgttctg gggaatttgt tagtcattac tgacaaggaa ataacaacga cgtagtattg 34200  
atc 34203

<210> 3

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: A mixed primer  
which has a DNA sequence deduced from the amino  
acid sequence of PKS of *Aspergillus flavus*.

<220>

<221> modified base

<222> (6)

<223> i

<220>

<221> modified base

<222> (9)

<223> i

<400> 3

gayacngcnt gyasttc

17

<210> 4

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: A mixed primer  
which has a DNA sequence deduced from the amino  
acid sequence of PKS of *Aspergillus flavus*.

<220>

<221> modified base

<222> (3)

<223> i

<220>

<221> modified base

<222> (6)

<223> i

<220>

<221> modified base

<222> (8)

<223> i

<220>

<221> modified base

<222> (15)

<223> i

<400> 4

tcnccnknrc wgtgncc

17

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 5

gcatgttcaa tttgctctc

19

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 6

ctggatcaga cttttctgc

19

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 7

gtcgcagtag catgggcc

18

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 8

gtcagagtga tgctcttctc

20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 9

gttgagagga ttgtgagggc

20

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 10



ttgcttggtg ttgattgtc

19

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 11

catggtactc tcgcccgttc

20

<210> 12

<211> 19

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 12

ctccccagta cgtaagctc

19

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 13

ccataatgag tgtgactgtt c

21

<210> 14

<211> 19

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 14

gaacatctgc atccccgtc

19

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 15

ggaaggcaaa gaaagtgtac

20

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 16

agattcattg ctgttgcat c

21

<210> 17

<211> 722

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 17

ggccacgcgt cgactagtagc gggggggggg gggggggggg gcttggttcgc tcagagattc 60

aactctgcga ttctgtttaa tcccaatcct atcgcccaaa aacaggatca gcagttatgg 120

atcaagccaa ctatccaaac gagccaattg tggtagtggg aagcggttgt cggtttccag 180  
 gtggtgtcaa cacaccatca aaactttggg agctgctcaa agagccccgg gatgtacaga 240  
 ccaagatccc taaggagaga tttagcgtcg atacatttta cagccccgat ggcactcacc 300  
 ccgggcgcac gaacgcaccc tttagcactt tgctgcagga ggatctacgc ggttttgatg 360  
 cctctttctt caacatccaa gctggagagg ccgaaacgat tgaccacacag caaaggctgc 420  
 tgctggagac ggtctatgaa gctgtatcca acgcaggcct acggatccaa ggccttcaag 480  
 gatcctctac tgctgtgtac gtcggtatga tgacgcatga ctatgagact atcgtgacgc 540  
 gtgaattgga tagtattcct acatactctg ccacgggggt agctgtcagt gtggcctcca 600  
 accgtgtatc atacttcttc gactggcatg ggccgagtat gacgatcgac acagcctgta 660  
 gttcatcctt agctgccgtg catctggccg tccaacagct tagaacgggc gagagtacca 720  
 tg 722

<210> 18

<211> 760

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 18

ggccacgcgt cgactagtac gggggggggg gggggggggg gactatcaac ggttttatca 60  
 ccagggcgac tgatatatca gtcaatgaaa caacgttga atgaacaata ccccgccgt 120  
 aaccgcaacc gcaaccgcaa ccgcaaccgc aaccgcaatg gcaggctcgg cttgctctaa 180  
 cacatccacg cccattgcc a tagttggaat gggatgtcga ttgctggag atgcaacgag 240  
 tccacagaag ctttgggaaa tggttgaaag aggaggcagt gcctgggtcta aggtcccctc 300  
 ctcgcgattc aatgtgagag gagtatacca cccgaatggc gaaagggtcg ggtccacca 360  
 cgtaaagggt ggacacttca tcgacgagga tcctgcttta tttagcggc cgttcttcaa 420  
 catgaccaca gaggtcgcca gctgcatgga tccgcagtat cggcttatgc ttgaggtggt 480  
 ctacgaatcg ctggagagt cgggtatcac catcgatggt atggcaggct ctaatacgtc 540  
 ggtgtttggg ggtgtcatgt accacgacta tcaggattcg ctcaatcgtg acccgagac 600  
 agttccgcgt tatttcataa ctggcaactc aggaacaatg ctttcgaacc ggatatcaca 660

cttctacgac ttacgtggtc ccagcgtgac ggttgacacg gcctgttcga cgacattgac 720  
cgactgcac ttggcgtgcc agagcttacg tactggggag 760

<210> 19

<211> 773

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 19

ggccacgcgt cgactagtag gggggggggg ggtttttttt ttttcaaggt tgactggaag 60  
agtgtctctg gccacaaaat ccagaagca ttagtgctgt tattcgatta taaaccgtcg 120  
cagcgtcttc attcttcgtt ctttcttctt ttccactggg gtgcataggt cctatctgtc 180  
tcacgcaatg ctcgccagg ttcttctgac cgtcgaatcg taccaatggg tatcgacccc 240  
tcaagccctt gtggcggtcg cagtgttct tagtctcatc gcctaccgtt tgcgggggag 300  
ccagtcgaa ctgcaagtct ataatccaa aaaatgggtg gagttgacga ccatgagggc 360  
taggcaggac ttcgatacgt atggtcgag ctggatcgaa gcttggttct cgaaaaacga 420  
caagcccctg cgcttcattg ttgattcgg ctattgcacc atcctcccat cgtccatggc 480  
cgacgagttt cggaatatca aagatatgtg catgtacaag tttttggcgg atgactttca 540  
ctctcatctc cctggattcg acgggttcaa ggaaatctgc caggatgcac atcttgtaa 600  
caaagttgtt ttgaaccagt tacaaccca agcccccaag tacacaaagc cattggctac 660  
cttgcccgac gctactattg ccaagttgtt cggtaaaagc gaggagtggc aaaccgcacc 720  
tgtctattcc aatggattgg acctgtcac acgaacagtc acactcatta tgg 773

<210> 20

<211> 527

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 20

ggccacgcgt cgactagtagt gggggggggg gtacctagga actgttcagt tgtccctccc 60  
 aaccccttgg gccgaacaac cttcctccaa tctacgacgg cagattatac ctaggcgcct 120  
 aaccgattag gttgctcatt cgattttgga gagactacct agctataggt accactccaa 180  
 gctgtagcac agacctttca gcatggtcgc ttcgttgcta cctctcgtt ttcgcggtag 240  
 ggaatcaatg aatcagcagc accctctacg ctcgggaaat cgggcattga cctccacact 300  
 ccaattttcta tccaaaacgg cgtgtctaca cccgatccat accgtttgca ccatagctat 360  
 tctagctagt accacatacg ttggactact caaagacagc ttcttccatg gccccgcaa 420  
 cgttgataaa gcagaatggg gctctttggt cgaaggaagt cgaagcttga tcaccggccc 480  
 acagaatggc tggaagtggc agagcttcga cggggatgca gatgttc 527

<210> 21

<211> 522

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 21

ggccacgcgt cgactagtagt gggggggggg gggggggggg ggatccatca atctgacttc 60  
 aggctagcgg accttaacga aacaacgaga gcgagatcat tcatacacca aaacacaggt 120  
 actatagaag cgccgcgcag tagagattca caccgcccct tgaagcaaaa gtcggaagga 180  
 attgcgcgat gtcagaacct ctacccccta aagaagggga accaaggcca cagaaggaag 240  
 aaagtcaaaa tgacacgctc gaagcgactg agtccaagtc ccagcacatc acaggcctca 300  
 agctcgggct ggtggttgct tcagttactt tcgtagcatt tttgatgctc cttgatatgt 360  
 ccattatcgt cacggcaatc ccacatatca caagcgagtt ccactctctg aacgatgtag 420  
 ggtggtacgg cagtgcctat cttctggcta actgtgctct ccagcccctg gccggtaaat 480  
 tgtatacact cttgggcttg aagtacactt tctttgcctt cc 522

<210> 22

<211> 541

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 22

ggccaacgct cgactagtag gggggggggg ggctcacctc acattatttg atcttaatcc 60  
aataattatg tccctgccgc atgcaacgat tccgacgaac ctacgccgct gcgcgtttcg 120  
acgctcatgt gaccgggtgc atgcacaaaa gctcaaagt accggtagca atgccaattt 180  
agtccgtgct cagtgtcaac gttgtcagca agccggatta aggtgtgtgt acagcgaaag 240  
gctaccaag cgcaatttac ataaagaagc cgcagctgga actacaagag ccacagaaac 300  
ctcacaaccg atgaccgcga catcttctac ggtcttctca tcattggcag agactcctcc 360  
accttactgc tcaccaccta cgcatattgg cacctcggca ctcaaggaaa cattatcaga 420  
accatcagcg gcaaccctgc aattctatga tacatcaatc aactttgatg atcccagatc 480  
gtttcccggc ggctggcctc agccaaatac atttcgcgac gatgccaaca gcaatgaatc 540  
t 541

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 23

atcataccat ctcaacaac 20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 24

gctagaatag gttacaagcc 20

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 25

acattgccag gcacccagac

20

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 26

caacgccc aa gctgccaatc

20

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 27

gtcttttctt actatctacc

20

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 28

ctttcccagc tgctactatc

20

<210> 29

<211> 1524

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 29

aactggaaga attcgcggcc gcaggaattt tttttttttt tttttttcaa cgaaggtaga 60  
 agtaattttg acaaagatac aagacgaatt cgctatttgt agatgaatat gcgtgtgtica 120  
 attgaagccg aattcaggat agatttgcca tctgctctat tgccaatttc taatccatct 180  
 ttatcatgaa caacactcaa accacacatc tgaattcacg gcgctgaacg atctaggcca 240  
 acttcagagc cgggttcacg gagaacatag tgaggattga agaaaagtgg tctacaaagg 300  
 cctgagcgtg ctcagggcca tacagcgagc tctgaagttt gacatgaatg agtgggtcct 360  
 tggtagggtc atcccacatc tcgagaacga tgcataagg agtgcgctca cgggaagcga 420  
 gaacactcgt cattttggca ttgccaattg agccactctc cgcttgaccc tgcttgtaat 480  
 caaagacagc ctggaacaag ggggcgtgtg tctgagtctt gggttcctcg cctgaggtag 540  
 ggagattcag gcctagacag tcgaggatga cgccatacgg caccgcgcg tgttgcatgg 600  
 cctcacgcac actgtccttg gtggctacaa ggtgctcgcc gaatgtcttg ctgccgacga 660  
 actcatcaaa gcgcagggga agcacgttag cgaaaaagcc catcgccgaa atttcttcca 720  
 tggtaggatcg gttggtttcg gcgaggccga tggttatgtc tttgctgccg gtaagacgcg 780  
 ccaacaaaac gtgtaggcg gccaggtaga actgcatggg ggttgccttg tgcttgccgc 840  
 tccgctcttt gattcggaag gcgaccatgg gatctaaacg agcaattgct tcatactgct 900  
 gccacgtgaa tggtgtgatt tgctgctgct ctgaattggc agcagggtca ttgatcagat 960  
 tcatgatggg aagcacggtt ggccgagatg acgagacttt gctatgcatg gacttccaga 1020  
 acgcgatatc gtccccatt cgcccathtt ccaggttttc ccgctgttgg acggctagat 1080  
 cagagaattg ggtcgatggt cgctgcattt tcaccccgct gtaaactctgc ccgatctcat 1140



tgaacagggtt tttgtttgtt gagccatcac caactaatct gtggtagccg attaccaaca 1200  
 ggtggtcatc tgtgccccag tagaaatcaa cgagtctgag agtgtcacct gtggagatgc 1260  
 tatagtttgt cttctcgagt ttcgggtact cttcctctgc ctccgcagcg ttgttcacct 1320  
 gaacaaagtg cactctgttc tccgggttct tgagaaccac ttggacggga ccatttaaata 1380  
 cgctgctata gtcacgcga gtaacaaagc acgtacggaa gatctcgtga cggcgcaatg 1440  
 aggctttcag agcccgccctc aaccgggtcga ggtcaatggt acccttcatg aacatgccaa 1500  
 tagtgtttgtt gaagatggta tgat 1524

<210> 30

<211> 784

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 30

aactggaaga attcgcggcc gcaggaattt tttttttttt tttttttttc tttgttgctt 60  
 ctcagggccca ctgtaatggt atttcaggta tctctattta ctgctatcca gaagtcaggc 120  
 attaaatagt caggctcagc ccaggctcga ttcagattgg attcaggctt cagaccatgg 180  
 ccgctatgct ccttcgtact atacctccgt cgagctatac ccgcttggcc agacaaaagg 240  
 cttcaactgaa cccttcaact taactgcatt tcgccacaac taactcgacg aggccggcga 300  
 tgggtgttacc attcatgagc tcaaagatcg acacatcaac atggatttca gatgtgatcc 360  
 agtttcgaag ttcaatggcg acgagtgagt ctacgccgac acctgccagg tttttggacg 420  
 aggacatgtc gtcttctgcc agaccaaaca ttcgcatcag cttttccgtc attgctttga 480  
 ggacgataga aatggcctcg tcgtgagagg tgacctgct tagttgggcc cgcacgccat 540  
 ctggtccttt tttatgcga gagacaaagg attggtctgc atgaaggact tggcggtatt 600  
 taagtccac aaaccgctgt tcctgtatcc agtttgcctc ggtccagtga gcaccggggg 660  
 atgtgttgat tcctgtaacc acagctgcgg gaggtgatgg aaattgaggg gaagaacaca 720  
 ggattgcctt ctccaacaca tccatgacgt ctttttcatg cataggcttg taacctattc 780  
 tagc 784

<210> 31

<211> 764

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 31

```
aactggaaga attcgcggcc gcaggaattt tttttttttt ttttttttc gaataaaatg 60
cgttttatatt tactaaccta ctgcactaat acagcaccta gtttctctgg gacggaaacc 120
attggaataa gcctggggac ggatgcatat ttgttttagt ttgcgtgtta tatcttagca 180
ccggtcatga gggagcggga tgtcctcggt gcgccggcgt accatgagct ttgtggttgg 240
atgcatacga acgctaaaag cgtgacggta gtatttgtca tcgtctcctg gtacaggcctt 300
cacatcatat tgaatcagta tatgagcgag gagaatcttg atttccttcg aggcgaagaa 360
ccgcccggga caagcgcgtg ggttccagcc gaagccgatg tgatcacctg tggtattctc 420
caattgagcg gtgaaggcct tgtctggatc ctgcgcgatg cgcataaatc ggtagggatc 480
ataattttcg gggttttccc acacatcagg gttgttcatg cggctctgcag ccacagcggc 540
caactcgccc ttgggaatga agaggccatt ggatagagtg atgtctctga gagcgggtact 600
gcgcatagtg gcgcactcga ccggcttgat tcgctgcgtc tctttcatgc agctgtcgag 660
gagcttcagc ttgaacagag aggcaggcgt ccagccccct tctccgatta cagtgcggat 720
ctcttggcgg agaggctgaa taaggtctgg gtgcctggca atgt 764
```

<210> 32

<211> 765

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 32

```
aactggaaga attcgcggcc gcaggaattt tttttttttt ttttttctgg aaaaggacca 60
tctctttata tattcttctt cctactact tgcactgtaa atttcaacaa catataaaca 120
tgagataccc tttctggccg ttcactctac cacctgcctg tctcattgca ttgtgctttt 180
```

gaaaattatg acaataacaa ccaatgagaa aaaatatgat cctcctgcaa tgaatccact 240  
 ggagggggta cggagcttgg aatgctccta agattccgac ctaatcagcg tcgagcccgga 300  
 tcagtagctg cagcactcgg cctcagtga ttgttaggaa cagggactgt cctggttccg 360  
 cctgacgggg agacacttcg agaaggggct gaagatgccg gggcagaacg gttgtgcgcc 420  
 atgtgcgcct tgaccaggtg accggcggct agggcagcac atagcgagag ctccccagcc 480  
 aaaacagcgc ttccgatgat gcgcgcaagt tgacgtgcat tctcaccggg agtggtcggg 540  
 tgtgatccgc ggacaccaag catgtcaagc attgcgccct ggggctccag aatcgtacca 600  
 ccgcccacg ttccaacctc aatagacggc atggagacag agatttgaag cgatccgcga 660  
 agattgttca tgagagtgat gcagttagcg ctctccacaa cttgcgccgg atcctgacct 720  
 gtggcaatga aaatggctgc cgcaagattg gcagcttggg cgttg 765

<210> 33

<211> 802

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 33

aactggaaga attcgcggcc gcaggaattt ttttttttt tttttataga atctttgaaa 60  
 tcgacattaa ttaagtatgt ggagattcct tgtggaggca cggtaatgtg tctatctagc 120  
 aacgcggtca agcatcagtc tcaggcacag cccgggtgtc gtttttggtt gcaatcttcc 180  
 gccatcccat tccaaaggca aacacaaacg tgcacgccgt agctcccact gctaagtaaa 240  
 aagtatgata aacggcgaga ctgtaagctt ttacaacccc tggaagggtta ttcttgctga 300  
 ccacatctct gaagccagtc gccctgtctg ccgtcacggc ctgcgtgtcg acagtgggcg 360  
 catacttgct caggccagtt ctcaaaccgg acccaaagac aaggtttagca aagtccagga 420  
 agagcgatcc tccaaacgct tgtccaaaca cggcgagaga aattccgagg gcaccttggt 480  
 cgggcgaaag cgtgctttgg atggcgatga taggcgtttg catgccacaa ccacgaccga 540  
 agcccgcgat aaattggtac atgaccatt tcacagttga tgtatggggc tggaagggtg 600  
 ataccagacc tgcgcctatg gcgacgagaa cagcgtgcc tagggcccaa ggcaaatagt 660  
 atcctgtctt tccaattgcg aagccagaaa ccatagccat aatgacttgt ccaagaattc 720

caggcaacat gtacacacca ctcaagtgtgg gagaaacatc cttcacagcc tggaagtaga 780  
tcggtagata gtaggaaaag ac 802

<210> 34

<211> 562

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 34

aactggaaga attcgcggcc gcaggaattt tttttttttt ttttttttac taagcaatat 60  
tgtgtttctt cgctaattcg aatatttcct tatagcaacg tcgcaacaca tttatcgtct 120  
tccctgaggc ctttgttgac ttgggctctt cgtctccggc ttcgtcactc caaagcacag 180  
ataggagacg agaggccggc gttatggttt tattttcagc gcccaaggatt tgccacgatg 240  
tgcttgcat atctgatagg actagacgaa tagatgccgc agccccgtgc tcctgtgcta 300  
tccccaaagc agtctcaatc ccactcaata gtcgaaggct tacacgcaat gtcgtgcatg 360  
cagaagataa ggcgtgcatg aatgggtcga gatgtgaaat gagctcgccg atatgaagat 420  
tagagtgaag cgagggaagt gcttcggctc ttccattgtc atttctagtg gttgagccag 480  
accagtacca atccattcgt gtgctttgct tttgtccaca aggttgggct ttcacacct 540  
cggatagtag cagctgggaa ag 562

<210> 35

<211> 31

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 35

ggatccatgt ccctgccgca tgcaacgatt c 31

<210> 36

<211> 30

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 36

ggatccctaa gcaatattgt gtttcttcgc

30

<210> 37

<211> 1380

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1380)

<400> 37

atg tcc ctg ccg cat gca acg att ccg acg aac cta cgc cgt cgc gcg 48

Met Ser Leu Pro His Ala Thr Ile Pro Thr Asn Leu Arg Arg Arg Ala

1

5

10

15

ttt cga cgc tca tgt gac cgg tgt cat gca caa aag ctc aaa tgt acc 96

Phe Arg Arg Ser Cys Asp Arg Cys His Ala Gln Lys Leu Lys Cys Thr

20

25

30

ggt agc aat gcc aat tta gtc cgt gct cag tgt caa cgt tgt caa caa 144

Gly Ser Asn Ala Asn Leu Val Arg Ala Gln Cys Gln Arg Cys Gln Gln

35

40

45

gcc gga tta agg tgt gtg tac agc gaa agg cta ccc aag cgc aat tta 192

Ala Gly Leu Arg Cys Val Tyr Ser Glu Arg Leu Pro Lys Arg Asn Leu

50

55

60

cat aaa gaa gcc gca gct gga act aca aga gcc aca gaa acc tca caa 240

His Lys Glu Ala Ala Ala Gly Thr Thr Arg Ala Thr Glu Thr Ser Gln

65

70

75

80

ccg atg acc gcg aca tct tct acg gtc ttc tca tca ttg gca gag act 288

Pro Met Thr Ala Thr Ser Ser Thr Val Phe Ser Ser Leu Ala Glu Thr

85

90

95

cct cca cct tac tgc tca cca cct acg cat att ggc acc tcg gca ctc 336

Pro Pro Pro Tyr Cys Ser Pro Pro Thr His Ile Gly Thr Ser Ala Leu

100

105

110

aag gaa aca tta tca gaa cca tca gcg gca acc ctg caa ttc tat gat 384

Lys Glu Thr Leu Ser Glu Pro Ser Ala Ala Thr Leu Gln Phe Tyr Asp

115

120

125

aca tca atc aac ttt gat gat ccc gag tcg ttt ccc ggc ggc tgg cct 432

Thr Ser Ile Asn Phe Asp Asp Pro Glu Ser Phe Pro Gly Gly Trp Pro

130

135

140

cag cca aat aca ttt cgc gac gat gcc aac agc aat gaa tct tcg ggg 480

Gln Pro Asn Thr Phe Arg Asp Asp Ala Asn Ser Asn Glu Ser Ser Gly

145

150

155

160

ata cca gat cta ggc tac gac ttt gaa ggc cct ttg gat gca acg gcg 528

Ile Pro Asp Leu Gly Tyr Asp Phe Glu Gly Pro Leu Asp Ala Thr Ala

165

170

175

cct gtc tcg cca tcg ctg ttt gac ctc gaa gta gag ggg aac tcg tca 576

Pro Val Ser Pro Ser Leu Phe Asp Leu Glu Val Glu Gly Asn Ser Ser

180

185

190

tcc gga caa tcc aac aca agc aac acg caa cga gac ctt ttc gaa agt 624

Ser Gly Gln Ser Asn Thr Ser Asn Thr Gln Arg Asp Leu Phe Glu Ser

195

200

205

ctg tcg gat gtg tca cag gac cta gag gta ata ctc cac ggg gtg act 672

Leu Ser Asp Val Ser Gln Asp Leu Glu Val Ile Leu His Gly Val Thr

210

215

220

gtg gaa tgg ccc aag caa aaa att tta agc tac ccg ata ggg gac ttt 720

Val Glu Trp Pro Lys Gln Lys Ile Leu Ser Tyr Pro Ile Gly Asp Phe

225

230

235

240

ttg aat gcc ttt ggt aga ttg cta cta cat ctt caa gaa cgt gtg atc 768

Leu Asn Ala Phe Gly Arg Leu Leu Leu His Leu Gln Glu Arg Val Ile

245

250

255

acg agc agc aat agc agc atg tta gat ggg tgt ctg caa acc aag aac 816

Thr Ser Ser Asn Ser Ser Met Leu Asp Gly Cys Leu Gln Thr Lys Asn

260

265

270

ttg ttc atg gcg gtg cat tgc tac atg ttg tct gtc aaa atc atg aca 864

Leu Phe Met Ala Val His Cys Tyr Met Leu Ser Val Lys Ile Met Thr

275	280	285	
tca ctt tcc cag ctg cta cta tcc gag gtg atg aaa gcc caa cct tgt			912
Ser Leu Ser Gln Leu Leu Leu Ser Glu Val Met Lys Ala Gln Pro Cys			
290	295	300	
gga caa aag caa agc aca cga atg gat tgg tac tgg tct ggc tca acc			960
Gly Gln Lys Gln Ser Thr Arg Met Asp Trp Tyr Trp Ser Gly Ser Thr			
305	310	315	320
act aga aat gac aat gga aga gcc gaa gca ctt ccc tcg ttt cac tct			1008
Thr Arg Asn Asp Asn Gly Arg Ala Glu Ala Leu Pro Ser Phe His Ser			
325	330	335	
aat ctt cat atc ggc gag ctc att tca cat ctc gac cca ttc atg cac			1056
Asn Leu His Ile Gly Glu Leu Ile Ser His Leu Asp Pro Phe Met His			
340	345	350	
gcc tta tct tct gca tgc acg aca ttg cgt gta agc ctt cga cta ttg			1104
Ala Leu Ser Ser Ala Cys Thr Thr Leu Arg Val Ser Leu Arg Leu Leu			
355	360	365	
agt gag att gag act gct ttg ggg ata gca cag gag cac ggg gct gcg			1152
Ser Glu Ile Glu Thr Ala Leu Gly Ile Ala Gln Glu His Gly Ala Ala			
370	375	380	
gca tct att cgt cta gtc cta tca gat atg cca agc aca tcg tgg caa			1200
Ala Ser Ile Arg Leu Val Leu Ser Asp Met Pro Ser Thr Ser Trp Gln			
385	390	395	400



atc ctt ggc gct gaa aat aaa acc ata acg ccg gcc tct cgt ctc cta 1248

Ile Leu Gly Ala Glu Asn Lys Thr Ile Thr Pro Ala Ser Arg Leu Leu

405

410

415

tct gtg ctt tgg agt gac gaa gcc gga gac gaa gag ccc aag tca aca 1296

Ser Val Leu Trp Ser Asp Glu Ala Gly Asp Glu Glu Pro Lys Ser Thr

420

425

430

aag gcc tca ggg aag acg ata aat gtg ttg cga cgt tgc tat aag gaa 1344

Lys Ala Ser Gly Lys Thr Ile Asn Val Leu Arg Arg Cys Tyr Lys Glu

435

440

445

ata ttc gca tta gcg aag aaa cac aat att gct tag

1380

Ile Phe Ala Leu Ala Lys Lys His Asn Ile Ala

450

455

460

<210> 38

<211> 459

<212> PRT

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 38

Met Ser Leu Pro His Ala Thr Ile Pro Thr Asn Leu Arg Arg Arg Ala

1

5

10

15

Phe Arg Arg Ser Cys Asp Arg Cys His Ala Gln Lys Leu Lys Cys Thr

20

25

30

Gly Ser Asn Ala Asn Leu Val Arg Ala Gln Cys Gln Arg Cys Gln Gln

35

40

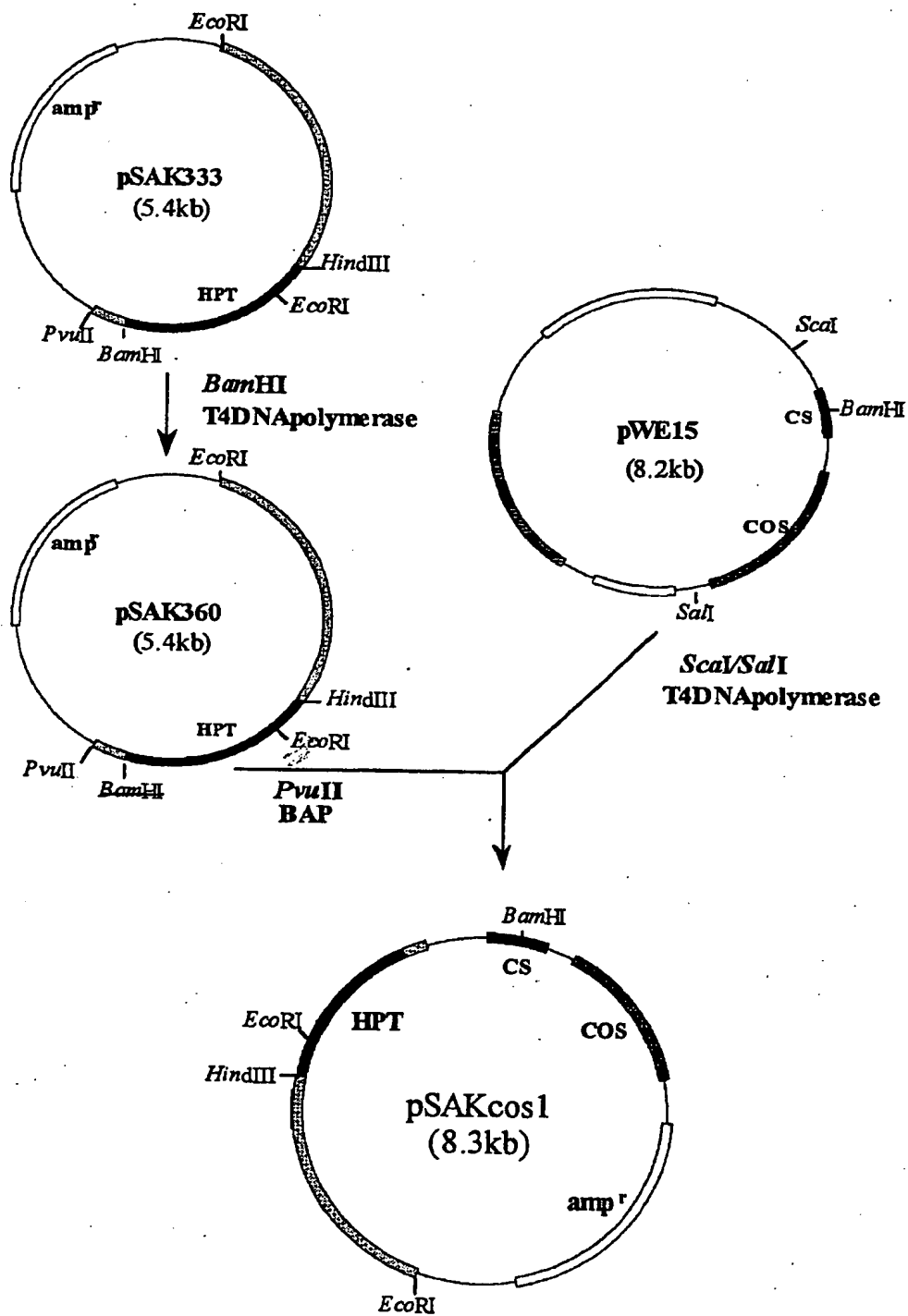
45

Ala Gly Leu Arg Cys Val Tyr Ser Glu Arg Leu Pro Lys Arg Asn Leu  
50 55 60  
His Lys Glu Ala Ala Ala Gly Thr Thr Arg Ala Thr Glu Thr Ser Gln  
65 70 75 80  
Pro Met Thr Ala Thr Ser Ser Thr Val Phe Ser Ser Leu Ala Glu Thr  
85 90 95  
Pro Pro Pro Tyr Cys Ser Pro Pro Thr His Ile Gly Thr Ser Ala Leu  
100 105 110  
Lys Glu Thr Leu Ser Glu Pro Ser Ala Ala Thr Leu Gln Phe Tyr Asp  
115 120 125  
Thr Ser Ile Asn Phe Asp Asp Pro Glu Ser Phe Pro Gly Gly Trp Pro  
130 135 140  
Gln Pro Asn Thr Phe Arg Asp Asp Ala Asn Ser Asn Glu Ser Ser Gly  
145 150 155 160  
Ile Pro Asp Leu Gly Tyr Asp Phe Glu Gly Pro Leu Asp Ala Thr Ala  
165 170 175  
Pro Val Ser Pro Ser Leu Phe Asp Leu Glu Val Glu Gly Asn Ser Ser  
180 185 190  
Ser Gly Gln Ser Asn Thr Ser Asn Thr Gln Arg Asp Leu Phe Glu Ser  
195 200 205  
Leu Ser Asp Val Ser Gln Asp Leu Glu Val Ile Leu His Gly Val Thr  
210 215 220  
Val Glu Trp Pro Lys Gln Lys Ile Leu Ser Tyr Pro Ile Gly Asp Phe  
225 230 235 240  
Leu Asn Ala Phe Gly Arg Leu Leu Leu His Leu Gln Glu Arg Val Ile  
245 250 255  
Thr Ser Ser Asn Ser Ser Met Leu Asp Gly Cys Leu Gln Thr Lys Asn  
260 265 270  
Leu Phe Met Ala Val His Cys Tyr Met Leu Ser Val Lys Ile Met Thr

275	280	285
Ser Leu Ser Gln Leu Leu Leu Ser Glu Val Met Lys Ala Gln Pro Cys		
290	295	300
Gly Gln Lys Gln Ser Thr Arg Met Asp Trp Tyr Trp Ser Gly Ser Thr		
305	310	315
Thr Arg Asn Asp Asn Gly Arg Ala Glu Ala Leu Pro Ser Phe His Ser		
	325	330
Asn Leu His Ile Gly Glu Leu Ile Ser His Leu Asp Pro Phe Met His		335
	340	350
Ala Leu Ser Ser Ala Cys Thr Thr Leu Arg Val Ser Leu Arg Leu Leu		
355	360	365
Ser Glu Ile Glu Thr Ala Leu Gly Ile Ala Gln Glu His Gly Ala Ala		
370	375	380
Ala Ser Ile Arg Leu Val Leu Ser Asp Met Pro Ser Thr Ser Trp Gln		
385	390	395
Ile Leu Gly Ala Glu Asn Lys Thr Ile Thr Pro Ala Ser Arg Leu Leu		
	405	410
Ser Val Leu Trp Ser Asp Glu Ala Gly Asp Glu Glu Pro Lys Ser Thr		415
	420	430
Lys Ala Ser Gly Lys Thr Ile Asn Val Leu Arg Arg Cys Tyr Lys Glu		
435	440	445
Ile Phe Ala Leu Ala Lys Lys His Asn Ile Ala		
450	455	

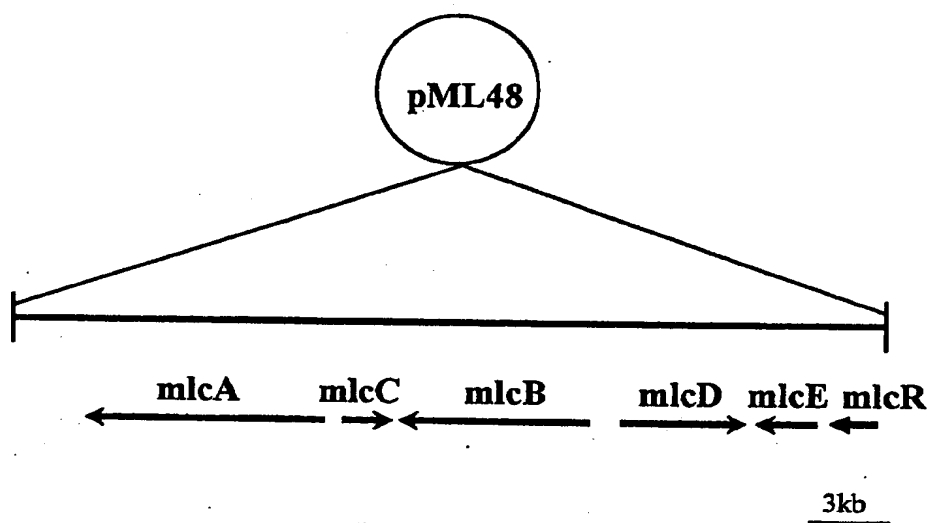
【書類名】 図面

【図 1】



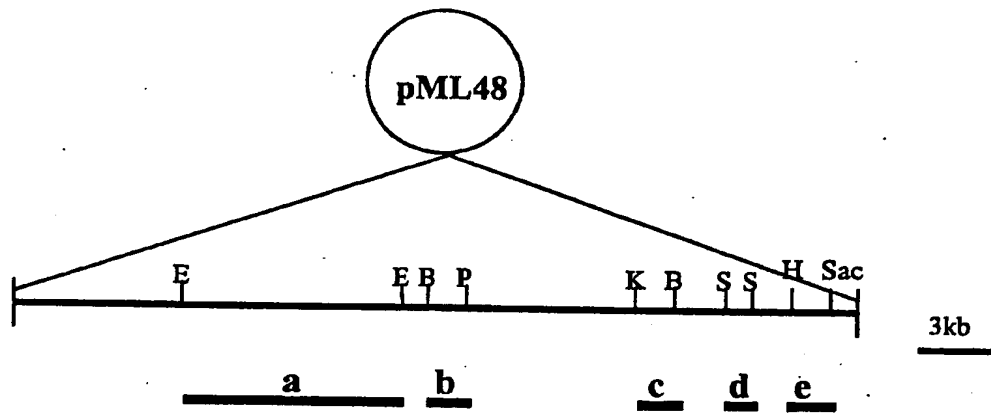
【図 2】

pML48 挿入配列上の推定構造遺伝子(mlcA,mlcB,mlcC,mlcD,mlcE,mlcR)の位置、  
大きさ及び方向



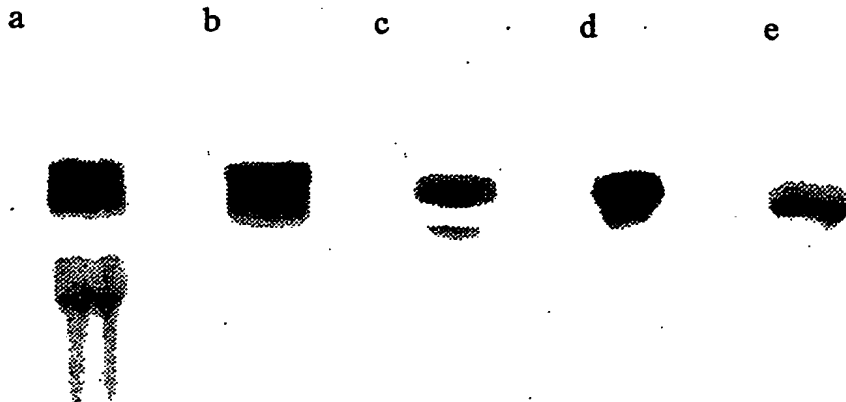
【図3】

A ノーザンブロット・ハイブリダイゼーションに使用したプローブ (a,b,c,d,e) の位置

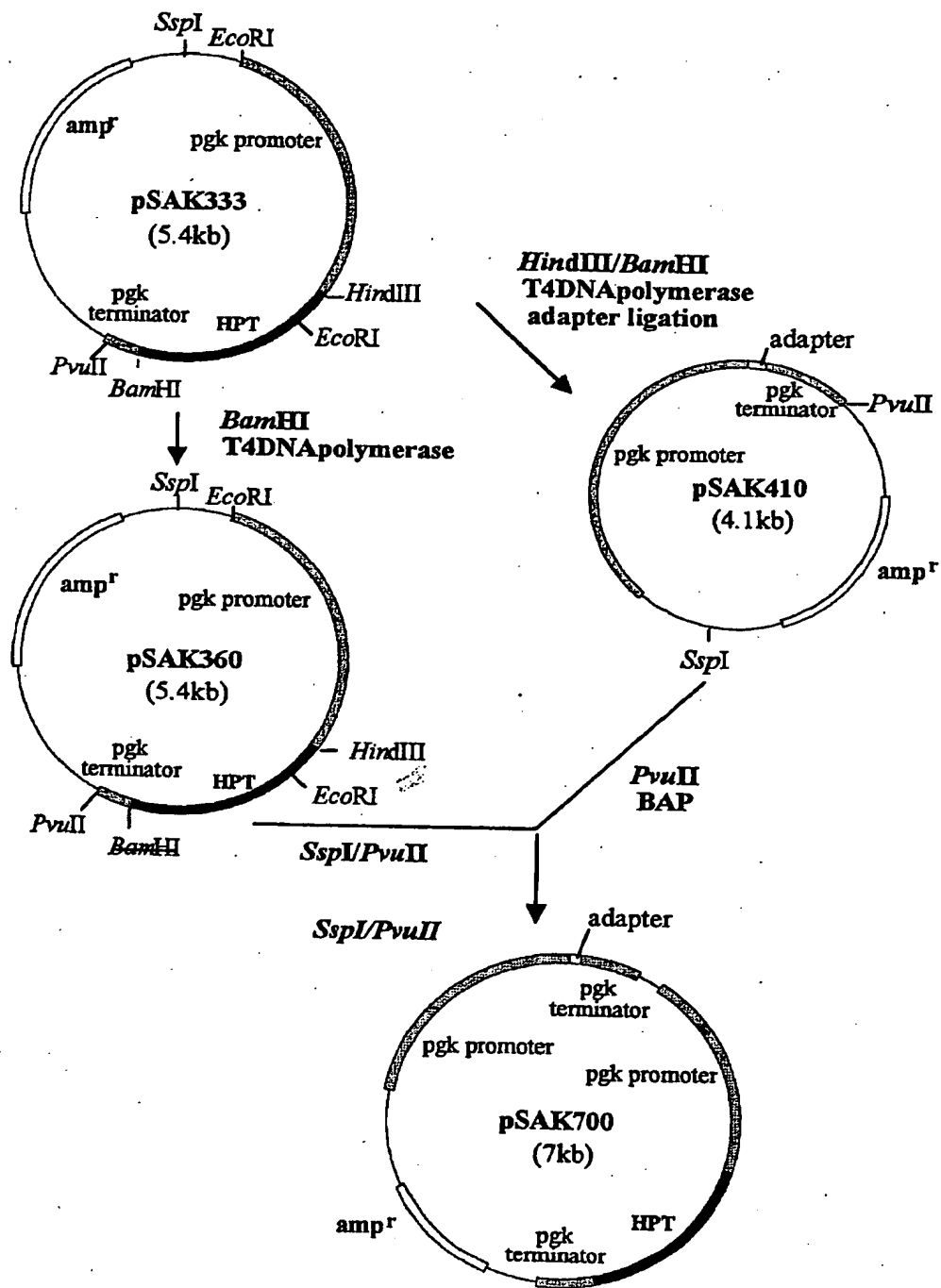


E; EcoRI, B; BamHI, P; PstI, K; KpnI, S; SalI, H; HindIII, Sac; SacI

B ノーザンブロット・ハイブリダイゼーションの結果



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ML-236Bの生合成を促進するDNAを取得すること。

【解決手段】 配列表の配列番号37のヌクレオチド番号1乃至1380で示される塩基配列を1つ以上含むことからなり、ML-236B生産菌内に導入されることにより該菌のML-236B生合成を促進することを特徴とするDNAを提供すること。

【選択図】 なし。



特2000-117458

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2000-117458
受付番号	50000491568
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成12年 4月20日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成12年 4月19日
-------	-------------

次頁無

特2000-117458

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001856]

1. 変更年月日 1990年 8月15日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 東京都中央区日本橋本町3丁目5番1号  
氏 名 三共株式会社